



**Universidade Norte do Paraná**

---

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO  
LEITE

**Vanessa Adelaide Romanholi André**

**MODIFICAÇÕES NA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA  
LACTOFERRINA BOVINA INDUZIDAS POR ALTA PRESSÃO.**

---

LONDRINA

2009

**VANESSA ADELAIDE ROMANHOLI ANDRÉ**

**MODIFICAÇÕES NA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LACTOFERRINA  
BOVINA INDUZIDAS POR ALTA PRESSÃO.**

Dissertação apresentada ao Curso de  
Mestrado Acadêmico em Ciência e  
Tecnologia do Leite da Universidade  
Norte do Paraná para obtenção do  
Título de Mestre em Ciência e  
Tecnologia do Leite.

Orientador:

Prof. Dr. Rafael Braga Gonçalves.

Londrina

2009

VANESSA ADELAIDE ROMANHOLI ANDRÉ

**MODIFICAÇÕES NA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA  
LACTOFERRINA BOVINA INDUZIDAS POR ALTA  
PRESSÃO.**

Dissertação do Mestrado para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite, aprovada, em 13 de fevereiro de 2009, pela banca examinadora constituída pelos professores:

---

Prof. Dr. Rafael Braga Gonçalves (orientador)  
Universidade Norte do Paraná

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Waleska Schwarcz  
Universidade Norte do Paraná

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Lina Casale Aragon Alegro (suplente)  
Universidade Norte do Paraná

Dedico este trabalho aos meus pais e  
minha irmã, pois sem eles hoje eu não  
seria quem eu sou.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, por iluminar meus caminhos e meus passos e por estar hoje onde estou.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Braga Gonçalves, pela amizade e companheirismo, por me escutar, me aconselhar, pelo ensinamento de um novo caminho e por incansavelmente ter me orientado em todas as minhas dúvidas e dificuldades.

Aos professores do mestrado pelo ensinamento e por nos mostrar caminhos diferentes a seguir.

Aos amigos do laboratório, em especial ao querido Jorge Donato Moraes, pela ajuda, pela compreensão e por agüentar nossas bagunças no laboratório.

Aos amigos de sala de aula, principalmente as meninas, Kamilla Lunardelo e Ana Paula Artimonte pela amizade, pelas horas de almoços, de conversas e apoio. E lógico, as queridíssimas Beatriz Ulate e Marisa Santini, que tantas vezes me ajudaram, não só com os estudos, mas também com carinho e amizade, sempre me aconselhando a seguir o melhor caminho.

A Lorena Carnelocce, por me acompanhar a primeira visita ao Rio de Janeiro, a fazer as primeiras atividades no laboratório da UFRJ e pela amizade.

A Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), pelo material de pesquisa cedido, laboratórios e bibliotecas.

Ao Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pela parceria, por permitir o uso do laboratório e materiais. Aos professores, Débora Foguel, Jerson Lima da Silva e Andréa Cheble de Oliveira por incentivar e apoiar este trabalho.

Ao Daniel Sanches por toda ajuda dada neste trabalho.

Aos meus pais e minha irmã, por tudo que fizeram em minha vida, me fazendo ser que sou hoje.

As minhas amigas, que compreenderam a minha ausência em todo este tempo de estudo.

“É melhor atirar-se à luta em busca de dias melhores, mesmo correndo o risco de perder tudo, do que permanecer estático, como os pobres de espírito, que não lutam, mas também não vencem, que não conhecem a dor da derrota, nem a glória de ressurgir dos escombros. Esses pobres de espírito, ao final de sua jornada na Terra não agradecem a Deus por terem vivido, mas desculpam-se perante Ele, por terem apenas passado pela vida.”

Bob Marley

ANDRÉ, V. A. R. **Modificações na estrutura tridimensional da lactoferrina bovina induzidas por alta pressão**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite) Universidade Norte do Paraná, Londrina.

### RESUMO

A lactoferrina (Lf) é uma glicoproteína ligadora de ferro presente em várias secreções como o leite, lágrima e saliva. É um monômero de 76 kDa que possui dois sítios de ligação a ferro. Muitas funções biológicas são atribuídas a Lf como resposta imune e atividade antimicrobiana. Alguns estudos recentes demonstram que a alta temperatura, quando aumentada gradativamente, leva a mudanças na estrutura secundária e terciária da Lf. Contudo, quando a temperatura era aumentada rapidamente (pasteurização) ocorriam alterações somente na estrutura terciária. Nesse estudo, o objetivo foi averiguar o efeito da alta pressão e baixa temperatura na estrutura da lactoferrina bovina (bLf). Para este fim, utilizamos a alta pressão hidrostática (APH), baixa temperatura e uréia para causar mudanças na bLf e assim obter dados que revelem mais detalhes a respeito do seu processo de desnaturação. As mudanças conformacionais foram monitoradas utilizando-se técnicas espectroscópicas como dicróismo circular (CD) e espectroscopia de fluorescência. Inicialmente o ponto final de desnaturação foi acessado com 8M de uréia sendo que essas mudanças foram monitoradas pela emissão de fluorescência dos triptofanos presentes na molécula. Nossos resultados mostraram também que a aplicação gradual da alta pressão hidrostática levou a desnaturação parcial menos drástica da bLf, quando comparada a desnaturação por uréia. Contudo, quando a pressão era aplicada rapidamente, a mesma variação só era alcançada com a amostra incubada sob alta pressão por 2 horas. O entendimento dos efeitos da alta pressão e baixa temperatura na bLf se faz muito importante uma vez que esse método de esterilização comercial tem crescido muito nas últimas duas décadas. Além disso, é fundamental o efeito desses agentes físicos na estrutura da bLf em virtude dela ser a proteína mais importante do soro do leite devido seu papel biológico.

**Palavras-chave:** lactoferrina, soro do leite, alta pressão, desnaturação, esterilização.

ANDRÉ, V. A. R. **Structural changes on tridimensional structure of bovine Lactoferrin induced by high pressure.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite) Universidade Norte do Paraná, Londrina.

### **ABSTRACT**

Lactoferrin (Lf) is an iron-binding glycoprotein present in several secretions such as milk, tear and saliva. It is a 76 kDa monomer that has two sites for iron binding. Many biological functions are related to Lf, like immune response and antimicrobial activity. Some recent study has demonstrated that low temperature increase could cause several changes on Lf secondary and tertiary structures. On the other hand, when temperature is increase rapidly (pasteurization), changes occurred only on tertiary structure. In this study, our main goal was to verify the effects of high pressure and low temperature on bovine lactoferrin (bLf). To this goal we have been use high hydrostatic pressure (HHP), low temperature and urea to promote structural changes and to obtain some data to reveal more details about its denaturation process. Conformational changes were monitored using spectroscopic techniques such as circular dichroism (CD) and fluorescence spectroscopy. The ending point of the denaturing was accessed using 8M urea where the changes are monitored by tryptophan fluorescence emission. Also, our results shown that the gradual pressure increasing leads a partial bLf denaturing, less drastic if compared with urea. However, when pressure was increased rapidly, the same change on tryptophan fluorescence emission was accessed only by incubation of bLf under high pressure for two hours. The understanding of the high pressure and low temperature effects on bLf becomes very important, once this method of commercial sterilization has increased in the last two decades. Also, the effects of physical agents on bLf structure are very important since this protein has emerged as the most important protein in whey due its biological role.

**Key words:** lactoferrin, whey, high pressure, denaturing, sterilization.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura 3D da lactoferrina bovina.....	26
Figura 2 – Sistema de Alta Pressão Hidrostática .....	33
Figura 3 – Espectro de emissão de fluorescência do triptofano.....	37
Figura 4 – Grau de exposição dos triptofanos presentes na estrutura da lactoferrina bovina.....	37
Figura 5 – Espectros de dicroísmo circular de componentes da estrutura secundária de proteínas.....	38
Figura 6 – Efeito da uréia na lactoferrina bovina acompanhada pelas mudanças no microambiente dos triptofanos .....	44
Figura 7 – Efeito da uréia na estrutura secundária da lactoferrina bovina acompanhada por dicroísmo circular .....	45
Figura 8 – Efeito da pressão na lactoferrina bovina acompanhada pelas mudanças no microambiente dos triptofanos.....	47
Figura 9 – Efeito do tempo na desnaturação por pressão da lactoferrina bovina acompanhada pelas mudanças no microambiente dos triptofanos.....	48
Figura 10 – Efeito do tempo na desnaturação por pressão da lactoferrina bovina acompanhada pelas mudanças no microambiente dos triptofanos .....	50
Figura 11 – Efeito do tempo na desnaturação por pressão combinada a uréia da lactoferrina bovina acompanhada pelas mudanças no microambiente dos triptofanos.....	51
Figura 12 – Efeito da baixa temperatura na lactoferrina bovina acompanhada pelas mudanças no microambiente dos triptofanos .....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do leite .....	18
Tabela 2 – Proteínas do leite bovino .....	20
Tabela 3 – Propriedades das proteínas do soro do leite .....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tri dimensional
APH	Alta pressão hidrostática
apo-Lf	Lactoferrina não ligada a ferro
Asp	Ácido Aspártico
bLf	Lactoferrina bovina
CD	Dicroísmo circular (“Circular Dichroism”)
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
HHP	Alta Pressão Hidrostática (High Hydrostatic Pressure)
His	Histidina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (“Human immunodeficiency virus”)
holo-Lf	Lactoferrina ligada a ferro
HTST	Alta Temperatura em Curto Tempo (High Temperature Short Time)
Igs	Imunoglobulinas
kDa	Kilo Dalton
Lf	Lactoferrina
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
pH	Potencial hidrogeniônico
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
U.V	Ultra-violeta
UHT	Temperatura ultra-alta (“Ultra high temperature”)

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 OBJETIVOS .....	16
2.1 OBJETIVO GERAL .....	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>17</b>
3.1 LEITE .....	17
3.1.1 COMPOSIÇÃO .....	18
3.1.2 PROCESSAMENTO .....	21
3.2 O SORO DO LEITE .....	23
3.3 A LACTOFERRINA BOVINA .....	25
3.4 ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA E BAIXA TEMPERATURA NAS PROTEÍNAS .....	28
3.5. A UTILIZAÇÃO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA INDÚSTRIA .....	33
3.6 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA .....	36
3.7 DICROÍSMO CIRCULAR .....	38
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>39</b>
4.1 PRESSÃO HIDROSTÁTICA E TERMODINÂMICA .....	39
4.2 MEDIDAS ESPECTROSCÓPICAS .....	40
4.2.1 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA .....	40
4.2.2 DICROÍSMO CIRCULAR NO UV-DISTANTE .....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

O leite é um produto de grande importância nutricional, pois seus nutrientes e os seus derivados, como o queijo e o iogurte, colaboram para um desenvolvimento saudável e diminuem o risco de doenças, sendo componentes importantes e indispensáveis de uma dieta equilibrada e nutritiva. Além de conferir suporte para o crescimento e desenvolvimento infantil, constituem seu alimento básico nos primeiros meses de vida.

A partir do século XIX, diversos desenvolvimentos tecnológicos foram aplicados ao leite de consumo até caracterizar seu mercado atual. Novos tratamentos térmicos, novas embalagens, novos sistemas de transporte e outras tecnologias, permitiram que o leite antes consumido sem nenhum tipo de tratamento, direto da vaca, pudesse chegar ao consumidor, em ótimas condições de consumo e armazenamento, seguro, com maior durabilidade, diferentes teores de gordura, quantidades de vitaminas, sabores, nutrientes etc.

Os principais componentes do leite são a água, carboidratos, lipídios, proteínas, sais minerais e vitaminas, onde os elementos sólidos representam aproximadamente 12 a 13% do leite e a água, aproximadamente 87%. O leite é, portanto, um alimento de grande importância na alimentação humana devido o seu elevado valor nutricional. O leite contém dois grandes grupos protéicos, as caseínas e as proteínas do soro, que diferem estrutural e funcionalmente. As proteínas do soro correspondem a 20% do total protéico do leite de vaca, e representam uma excelente fonte de proteínas com importante atividade biológica e de alto valor nutricional devido serem ricas em aminoácidos essenciais. Dos 20% das proteínas do soro, 70 - 80% correspondem as proteínas  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulinas. A outra parte é composta imunoglobulinas (Igs), glicomacropéptídeos, albumina do soro, lactoferrina, lactoperoxidase e algumas enzimas.

Dentre as mais variadas e ainda pouco estudadas funcionalidades das proteínas do soro podemos destacar algumas como: atividade antioxidante, atividade antibactericida e antiviral, modulação da atividade do sistema imune.

A lactoferrina (Lf) é uma glicoproteína ligadora de ferro pertencente à família da transferrina e é encontrada em diversas secreções como o leite, a lágrima, a saliva e tem se mostrado como a mais importante proteína do soro do leite devido sua atividade antimicrobiana, e entre outras funções atribuídas tais como imunomodulação, regulação do crescimento celular, função antitumoral, atividade antioxidante e antiinflamatório. O leite é a mais abundante fonte de Lf, sendo que o colostro humano contém mais de 7 g/L desta proteína. A concentração da Lf no sangue é normalmente cerca de 1 µg/mL, embora possa aumentar para mais de 200 µg/mL durante um processo inflamatório.

Uma vez que a Lf possui inúmeras funções biológicas é necessário um melhor entendimento sobre sua dinâmica estrutural, a fim de que seja possível correlacioná-la com cada uma de suas funções.

A pressão hidrostática é uma ferramenta poderosa para estudar o envelhecimento de proteínas bem como sua dinâmica e a estabilidade. Recentemente, as técnicas da pressão abriram um caminho importante para ajudar a compreensão de como os polipeptídeos envelham-se. Os estudos cinéticos sob pressão proporcionam uma detalhada avaliação e compreensão do processo de envelhecimento protéico. A utilização de altas pressões hidrostáticas tem inúmeras vantagens sobre outros métodos, pois além de promover mudanças estruturais menos drásticas, não alteram quimicamente a amostra, o que seria altamente indesejável, pois a pressão apenas altera o volume do sistema. Esta característica contrasta com as perturbações da alta temperatura e os agentes desnaturantes, cujos efeitos dependem dos vários fatores. Um aumento na temperatura produz mudanças simultâneas na energia e no volume total.

A utilização da pressão combinada com baixa temperatura é uma ótima estratégia para causar mudanças na estrutura da bLf uma vez que a pressão permite que se alcancem temperaturas abaixo de zero sem haver congelamento, uma vez que sob pressão o comportamento físico da água é diferente daquele à pressão. Quando uma solução de proteína é pressurizada, a proteína é desnaturada reversível ou irreversível dependendo da natureza da proteína e da pressão aplicada. Isto acontece

por causa das ligações não covalentes (ponte de hidrogênio, ligações iônicas e ligações hidrofóbicas) que são destruídas ou formadas, correspondendo à diminuição no volume do sistema.

O uso mais freqüente da HHP no processamento de alimentos tem sido a esterilização comercial, com conseqüente prolongamento da vida-de-prateleira. Essa tecnologia permite várias aplicações para a indústria de alimentos como, desnaturação de proteínas e enzimas, redução da temperatura de congelamento e de descongelamento, extração de substâncias orgânicas e controle de reações químicas e sínteses orgânicas.

## **2 - OBJETIVOS**

### 2.1 OBJETIVO GERAL:

- Verificar o efeito da alta pressão e baixa temperatura na estrutura da lactoferrina bovina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar mudanças nas estruturas terciária e secundária da lactoferrina bovina através de espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular (CD).
- Avaliar as mudanças nas estrutura da lactoferrina bovina quando submetida a alta pressão.
- Verificar mudanças na lactoferrina bovina durante o processo de abaixamento da temperatura.
- Observar o efeito da uréia na desnaturação da lactoferrina bovina.



### 3 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 LEITE

O leite é um produto de grande importância nutricional, pois seus nutrientes e os seus derivados, como o queijo e o iogurte, colaboram para um desenvolvimento saudável e diminuem o risco de doenças, sendo componentes importantes e indispensáveis de uma dieta equilibrada e nutritiva. Além de conferir suporte para o crescimento e desenvolvimento infantil, constituem seu alimento básico nos primeiros meses de vida (SGARBIERI, 2004).

A origem do leite de consumo no Brasil está intimamente ligada à exploração do gado trazido durante o período de colonização. O gado foi utilizado primeiramente como força de trabalho nos engenhos de cana de açúcar e posteriormente a pecuária de corte se desenvolveu em regiões como Goiás e o Sul do país. Até meados do Século XIX o consumo de leite teve caráter secundário, com poucas vacas sendo mantidas para essa atividade. A pequena disponibilidade do produto impediu que o consumo de leite se tornasse um hábito naquela época.

A partir de então, diversos desenvolvimentos tecnológicos foram aplicados ao leite de consumo até caracterizar seu mercado atual. Novos tratamentos térmicos, novas embalagens, novos sistemas de transporte e outras tecnologias, permitiram que o leite antes consumido sem nenhum tipo de tratamento, direto da vaca, pudesse chegar ao consumidor, em ótimas condições de consumo e armazenamento, seguro, com maior durabilidade, diferentes teores de gordura, quantidades de vitaminas, sabores, nutrientes e etc. (ALVES,2001)

Nos últimos cinco anos da década de 90 a produção brasileira de leite cresceu em média 4% ao ano. A informalidade aumentou no período pois o leite sem inspeção oficial cresceu 6,53%. No mesmo período, a participação do volume de leite importado na oferta total variou de 14,8%, em 1995, até 8,4%, em 2000, sendo a menor participação dos últimos cinco anos.

No ano de 2000, do leite ofertado formalmente, incluindo as importações, 50% foi destinado a leite de consumo, sendo 12% leite pasteurizado, 26% leite longa vida e 12% leite em pó de consumo. Lamentavelmente, as vendas de leite “in natura” continuaram elevadas mantendo-se em quase 2 bilhões de litros, nesse mesmo ano (ABLV, 2000)

### 3.1.1 Composição

O leite, por definição do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas.

Os principais componentes do leite são a água, carboidratos, lipídios, proteínas, sais minerais e vitaminas, onde os elementos sólidos representam aproximadamente 12 a 13% do leite e a água, aproximadamente 87% (**Tab. 1**) (ANTUNES, 2003). O leite é, portanto, um alimento de grande importância na alimentação humana devido o seu elevado valor nutricional.

**Tabela 1: Composição do leite.**

COMPONENTES PRINCIPAIS	COMPOSIÇÃO MÉDIA
Água	87,0%
Sólidos Totais	13,0%
Gordura	3,9%
Proteínas	3,4%
Lactose	4,8%
Minerais	0,8%

Fonte: Adaptado de ANTUNES, 2003.

O componente que existe no leite em maior quantidade é a água, onde se encontram dissolvidos, suspensos ou emulsionados os demais componentes (carboidratos, lipídios, sais minerais, vitaminas e proteínas) (PEREIRA et al., 2001).

A lactose, sendo o principal carboidrato do leite, é responsável pelo gosto adocicado. Sua concentração no leite é de aproximadamente 5%, sendo um dos elementos mais estáveis do leite. Além da lactose, podem ser encontrados no leite outros carboidratos, como a glicose e a galactose, mas em pequenas quantidades (GONZÁLEZ, 2001).

A gordura do leite está presente na forma de pequenos glóbulos, suspensos na fase aquosa. Cada glóbulo é envolvido por uma camada formada por um componente da gordura denominado fosfolípídio, que forma uma membrana impedindo a união de todos os glóbulos. O componente lipídico do leite é formado por uma complexa mistura, sendo os triglicerídios os mais importantes e mais abundantes lipídios, cuja concentração é de 98% em relação aos outros lipídios que existem no leite (GONZÁLEZ, 2001). A gordura é o constituinte que mais sofre variações em razão da alimentação, raça, estação do ano e período de lactação, podendo variar de 3,5 e 5,3% (PEREIRA et al., 2001).

Os principais minerais encontrados no leite são cálcio e o fósforo, e em menor quantidade potássio, cloro, magnésio e sódio. A ação fisiológica dos diferentes sais do leite é importante, principalmente do fosfato de cálcio, na formação de ossos e dentes. O leite é uma fonte excelente da maioria dos sais minerais necessários para o desenvolvimento dos indivíduos (EMBRAPA, 2008).

O leite é uma importante fonte de vitaminas, onde se pode encontrar todas as vitaminas conhecidas, apesar de estarem em concentrações muito baixas (PEREIRA et al., 2001). As vitaminas A, D, E e K estão associadas com a gordura, enquanto outras associam-se com a parte aquosa. Dentre as últimas, estão as do complexo B e a vitamina C. A concentração das vitaminas lipossolúveis é dependente da alimentação do gado, exceto a vitamina K. Essa, como as vitaminas hidrossolúveis, é sintetizada no trato digestivo dos ruminantes (PEREIRA et al., 2001).

As proteínas do leite representam entre 3 a 4% dos sólidos encontrados no leite, e são elas juntamente com os glóbulos de gordura que dão ao leite a cor esbranquiçada opaca. O leite contém dois grandes grupos protéicos, as caseínas e as proteínas do soro, que diferem estrutural e funcionalmente. A fração caseíca compõe aproximadamente 80% do total das proteínas do leite de vaca, e atua como carreadora

de minerais como cálcio, zinco, cobre, ferro e íons fosfato. A importância industrial da caseína está principalmente na fabricação do queijo (EMBRAPA, 2008). As proteínas do soro correspondem a 20% do total protéico do leite de vaca, e representam uma excelente fonte de proteínas com importante atividade biológica e de alto valor nutricional devido serem ricas em aminoácidos essenciais. Dos 20% das proteínas do soro, 70 - 80% correspondem às proteínas  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulinas. A outra parte é composta imunoglobulinas (Igs), glicomacropéptídeos, albumina do soro, lactoferrina, lactoperoxidase e algumas enzimas (**Tab. 2**) (ANTUNES, 2003; KORHONEN et al., 1998).

**Tabela 2: Proteínas do leite bovino.**

<b>COMPONENTES</b>	<b>% TOTAL</b>	<b>% SORO</b>
<b>Caseínas</b>	<b>80</b>	-
Caseínas $\alpha$ 1	36	-
Caseínas $\alpha$ 2	9	-
$\beta$ -Caseína	21	-
$\kappa$ -Caseína	12	-
$\lambda$ -Caseína	4	-
<b>Soro</b>	<b>20</b>	-
$\beta$ -Lactoglobulina	10	50
$\alpha$ -Lactalbumina	4	20
Imunoglobulinas	2	10
Albumina do Soro	1	5
Lactoferrina	-	1-2
Lactoperoxidase	-	0,2
Lisozima	-	0,1

Fonte: Adaptado de ANTUNES, 2003.

### 3.1.2 - Processamento

No Brasil, até o início do século XX, o leite era consumido sem nenhum tipo de tratamento podendo, por isso, causar uma série de doenças aos consumidores. O transporte do leite que era feito pelos escravos, em latões, passou a ser feito pelos vaqueiros que o produziam nas periferias das cidades. Entregue diretamente ao consumidor, tinha um curtíssimo prazo de validade.

Mesmo com o crescimento das cidades, no início do século XX, e com o distanciamento dos produtores de leite, da zona urbana consumidora, o leite ainda era entregue de porta em porta, transportado em latões, trazidos pelas carrocinhas puxadas por cavalos (ALVES, 2001).

A partir da década de 20, algumas indústrias para beneficiamento e distribuição de leite começam a surgir, oferecendo aos consumidores leite tratado pelo processo de pasteurização lenta (30 minutos à temperatura maior que 60 °C), tecnologia que surgia no país. O leite era engarrafado em frascos de vidro retornáveis. Tal avanço proporcionava ao consumidor um produto seguro, com prazo de validade maior do que o leite entregue pelos vaqueiros (ALVES, 2001).

As primeiras empresas processadoras de leite dedicavam-se a produção de queijo, com tecnologia bem rudimentar. Em 1918 surge no Brasil a primeira fábrica de leite em pó, sendo o produto comercializado principalmente para outras indústrias como insumo ou ingrediente. Em 1920, inicia-se a produção de leite condensado. (MEIRELES, 1983)

Durante muito tempo, mesmo nas grandes cidades como São Paulo, o leite pasteurizado era ofertado simultaneamente ao leite sem nenhum tipo de tratamento. Somente em 1939 o governo do Estado de São Paulo decreta que todo o leite distribuído à população deveria ser obrigatoriamente pasteurizado. Neste mesmo decreto são definidos, pela primeira vez, os tipos de leite pasteurizado: A, B e C. Esta determinação posteriormente seria estendida a todo país com a publicação do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), em 1952 (ALVES, 2001).

Em 1940, outras exigências passam a ser feitas na comercialização do leite pasteurizado. As garrafas de vidro deveriam possuir fecho inviolável, além de trazer a marca da empresa e a data de validade. O consumidor passa a ter acesso ao leite com padrão conhecido e maior confiabilidade (ALVES, 2001).

Após 1940 a pasteurização lenta passa a ser substituída pela pasteurização rápida (HTST - alta temperatura em curto tempo) que consiste em elevar a temperatura do leite de 72 a 76 °C por 15 a 20 segundos, seguida de rápido resfriamento. A maior rapidez do processo veio facilitar as operações industriais. Este avanço, que levou ao aumento da produtividade das empresas, poderia significar uma melhoria na lucratividade das mesmas. Entretanto, a intervenção do governo no setor, a partir de 1945, modificaria este quadro (MEIRELES, 1983).

O tabelamento do leite iniciado em 1945 no Rio de Janeiro, que se estendeu a todo país desde então, durou quase cinquenta anos. Todavia, ao contrário do propósito declarado pelo governo federal, o tabelamento que fixava preços e margens ao produtor, usina e consumidor não estimulou a produção de leite, nem tampouco a regularização do abastecimento, mas acabou inibindo o desenvolvimento do setor. As margens estreitas das usinas não impediram, no entanto, que ocorresse algum desenvolvimento tecnológico. Na década de 60 uma nova tecnologia é lançada no mercado de leite fluido: a embalagem descartável. A primeira tentativa foi a embalagem cartonada revestida de polietileno em formato tetraédrico, principalmente para o leite tipo B. Mas é no final dos anos 60 que as embalagens descartáveis ganham destaque no setor de leite fluido, com o lançamento do leite tipo C em sacos de polietileno (MEIRELES, 1983).

Nos anos 70 todo o leite pasteurizado passa a ser envasado em embalagens descartáveis. Consumidores e indústrias ganham com a redução das operações de recolhimento e higienização das embalagens retornáveis. Além disso, o segmento das industrializadoras passa por um processo de grandes inovações, como o lançamento dos iogurtes e sobremesas lácteas em embalagens descartáveis e bastante atrativas.

Em 1972, é lançado no Brasil o leite submetido a um novo tipo de tratamento térmico: a ultra pasteurização. Neste processo, a temperatura do leite é elevada a 130–150 °C por 2 a 4 segundos. Como resultado elimina-se do leite não apenas os

microrganismos patogênicos, mas todos aqueles também responsáveis pela deterioração do produto. O consumidor passa a ter acesso a um produto seguro, com extenso prazo de validade e que pode ser armazenado à temperatura ambiente (MEIRELES, 1983).

Embora a ultra pasteurização tenha sido desenvolvida nos EUA e Europa nas décadas de 40 e 50, somente após o desenvolvimento da embalagem asséptica, na década de 60, na Suécia, que a comercialização do leite longa vida (UHT) torna-se viável. O leite longa vida mostrou-se um produto bastante adequado às condições brasileiras, uma vez que sua comercialização não requer sistemas de distribuição refrigerados. Posteriormente seria desenvolvida também a tecnologia de reciclagem total da embalagem cartonada asséptica, possibilitando minimizar os impactos negativos da embalagem ao meio ambiente (ALVES, 2001).

### 3.2 – O SORO DO LEITE

O soro do leite é oriundo da fabricação de queijos, a partir da separação da caseína. Enquanto as caseínas sofrem coagulação, as proteínas do soro permanecem solúveis. O soro do leite é composto basicamente por  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina, soro albumina, lactoferrina, imunoglobulinas, lactoperoxidase, glicomacropéptidos, lactose e minerais (FARREL et al., 2004). Dentre as mais variadas e ainda pouco estudadas funcionalidades das proteínas do soro podemos destacar algumas como: atividade antioxidante, atividade antibactericida e antiviral, modulação da atividade do sistema imune (MARSHALL, 2004), como pode ser visto na **tabela 3**.

**Tabela 3: Funções das Proteínas do soro do leite.**

COMPONENTE DO SORO DO LEITE	% NO SORO	FUNÇÕES
$\beta$ -Lactoglobulina	50-55%	Fonte de aminoácidos essenciais de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina)
$\alpha$ -Lactalbumina	20-25%	Fonte de aminoácidos essenciais de cadeia ramificada
Imunoglobulinas	10-15%	Imunomoduladoras
<b>Lactoferrina</b>	<b>1-2%</b>	<b>Antioxidante, antibacteriana, antiviral, antifúngica.</b>
Lactoperoxidase	0.5%	Antibacteriana
BSA	5-10%	Fonte de aminoácidos essenciais
Glicomacropéptídeos	10-15%	Fonte de aminoácidos essenciais de cadeia ramificada

Fonte: Adaptado de MARSHALL, 2004.

Nos últimos anos os constituintes do leite têm sido reconhecidos como alimentos funcionais, sugerindo que seu uso teria um efeito direto e mensurável em benefícios para a saúde (RICHARDS, 2002). Durante muito tempo o soro do leite foi considerado um subproduto da fabricação do leite, e era descartado pela indústria de laticínios (MACHADO, 2002). Além de um grande desperdício, já que este soro é riquíssimo em proteínas e lactose, se não for adequadamente tratado, o descarte deste soro representa para o meio ambiente um possível agente poluidor.

A descoberta das aplicações nutricionais e funcionais das proteínas do soro do leite e as novas técnicas aplicadas ao estudo do soro e de seus componentes têm crescido exponencialmente nos últimos dez anos e tem levado a descoberta de várias aplicações para este grupo de proteínas. Pesquisas têm demonstrado os benefícios do uso das proteínas do soro em produtos lácteos e embutidos de carne contribuindo para o aumento do sabor, textura, diminuição de sinerese, como emulsificantes, antioxidantes e bactericida aumentando assim o tempo de vida de prateleira dos produtos (ANTUNES, 2003).

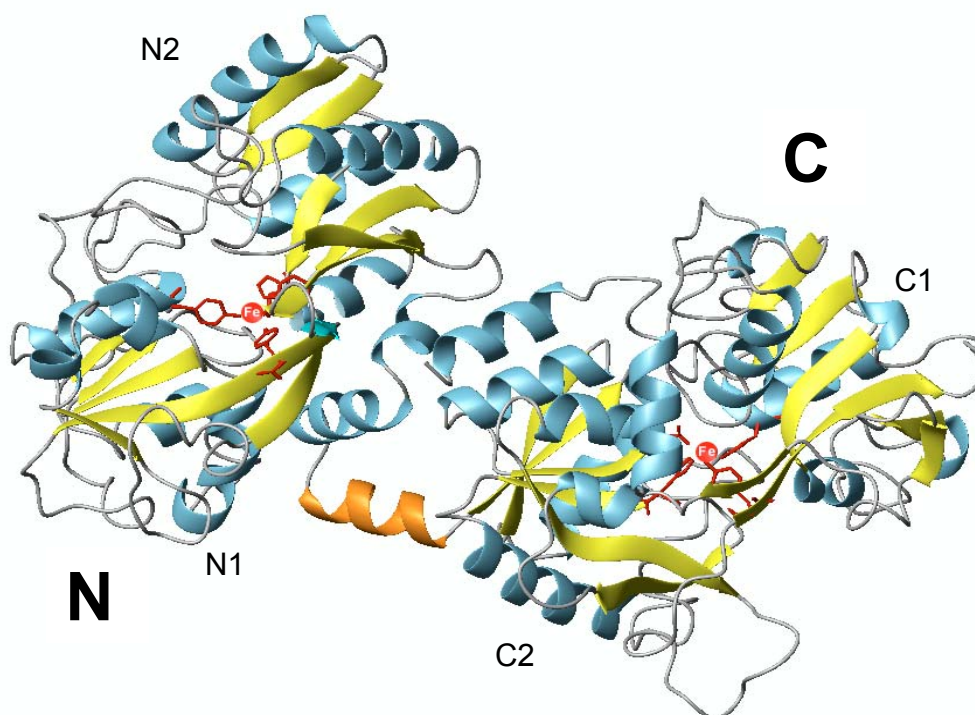
As novas tecnologias multifuncionais e nutracêuticas aplicadas ao soro do leite já vêm sendo utilizadas nos Estados Unidos e na Europa, entretanto no Brasil a sua utilização ainda é subestimada. O Brasil, em 2004, produziu 450 mil toneladas de



queijo, e isto significa que mais de quatro milhões de toneladas de soro do leite foi descartado (ANTUNES, 2003). Analisando a situação econômica e a tendência de ascensão da indústria de laticínios nacional, tornam-se extremamente necessárias pesquisas que visem à otimização do uso do soro do leite, uma vez que estes estudos terão um importante impacto social e econômico. Desse modo, surge a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre a estrutura/função das proteínas que o compõem.

### 3.3 – A LACTOFERRINA BOVINA

A estrutura tridimensional da Lf foi determinada em 1997 por Moore e colaboradores, utilizando-se cristalografia por difração de raios-x, como sendo composta por uma única cadeia polipeptídica de 76 kDa. O monômero pode ser dividido em dois lobos (C e N) que são unidos por uma  $\alpha$ -hélice. Cada lobo pode ser dividido em dois domínios (C1/C2 e N1/N2). A molécula possui dois sítios de ligação para ferro, sendo afinidade da Lf por esse metal é 260 vezes maior do que a transferrina, proteína transportadora de ferro no sangue (BAKER et al., 1994) (**Fig. 1**).



**Figura 1: Representação esquemática da estrutura 3D da lactoferrina bovina.**

O lobo N e o lobo C são conectados pela  $\alpha$ -hélice mostrada em laranja. Em vermelho estão destacados os aminoácidos que formam o sítio de ligação para ferro. Essa estrutura foi desenhada para este trabalho utilizando-se o software MolMol (KORADI et al., 1996) à partir de dados cristalográficos depositados no "Protein Data Bank" sob o nº 1BLF (MOORE et al., 1997).

Uma vez que a Lf possui inúmeras funções biológicas já descritas é necessário um melhor entendimento sobre sua dinâmica estrutural, a fim de que seja possível correlacioná-la com cada uma de suas funções (BAKER; BAKER, 2008). A flexibilidade e dinâmica da estrutura da Lf dependem diretamente de sua capacidade em ligar íons ferro. Apesar de a Lf ter a capacidade de ligar vários íons metálicos, tais como manganês, cobre, cobalto e zinco, nenhum deles liga-se a Lf com tanta afinidade quanto o ferro (BAKER, 1994b). A Lf possui dois sítios de ligação para ferro, sendo um em cada lobo. Tanto no lobo N quanto no C, a ligação desse íon é coordenada por quatro aminoácidos (duas Tyr, uma Asp e uma His) (MOORE et al., 1997). O sítio de ferro no lobo C encontra-se menos exposto e, como consequência, a ligação desse íon nesse sítio é comparativamente mais estável do que no lobo N (SGARBIERI, 2005). Em sua forma apo, ou seja, sem a ligação de  $\text{Fe}^{3+}$ , o sítio de ligação permanece em sua conformação mais aberta, enquanto que a ligação do íon ferro (forma holo)

proporciona uma mudança que leva a uma conformação fechada. Estudos estruturais já realizados demonstraram algumas conclusões sobre a dinâmica conformacional da Lf. A ausência do íon ferro leva a Lf a uma conformação mais aberta na região do sítio de ligação, sendo que essa conformação torna a proteína menos estável e mais susceptível a proteólise e desnaturação térmica (BALI; AISEN, 1991). Por outro lado, a ligação de ferro leva a proteína a uma conformação fechada o que aumenta sua rigidez e conseqüentemente a estabilidade frente à desnaturação térmica (GERSTEIN et al., 1993). A liberação de íons ferro da Lf depende da desestabilização da forma fechada (holo) e esta desestabilização pode ser causada por abaixamento de pH ou a utilização de agentes quelantes (BALI; AISEN, 1991). É importante salientar que as mudanças conformacionais que diferenciam a forma apo da forma holo devem-se simplesmente a pequenas mudanças conformacionais nos domínios da Lf (ANDERSON et al., 1990; GERSTEIN et al., 1993).

Proteínas e peptídeos antimicrobianos são sintetizados por uma grande de variedade de organismos com o objetivo de atuarem como a primeira linha de defesa contra infecções e são encontrados em diversos fluídos corporais. Das mais abundantes podemos citar a lisozima, colectina e lactoferrina (JENSSEN et al., 2008). A lactoferrina é considerada como uma importante molécula do sistema de defesa de recém-natos. Uma das primeiras atividades antimicrobianas descobertas para a lactoferrina foi sua habilidade em seqüestrar ferro do meio tornando-o indisponível para as bactérias (BULLEN; ROGERS; LEIGH, 1972; ARNOLD; COLE; MCGHEE, 1977). Essa descoberta levou-se acreditar, durante muito tempo, que esse era o único mecanismo de ação antimicrobiana da Lf. Diversos estudos demonstravam que a apo-Lf possuía atividade antimicrobiana e que essa atividade era reduzida quando a Lf era saturada por ferro (ARNOLD; BREWER; GAUTHIER, 1980; YAMAUCHI et al., 1993). Somente um ano mais tarde, Arnold e colaboradores verificaram o efeito bactericida da Lf sobre o *Streptococcus mutans* e a hipótese levantada era que a Lf estaria interagindo diretamente com a superfície celular da bactéria (ARNOLD et al., 1981).

Experimentos de cristalografia por difração de raios-x da Lf mostraram que a proteína possui regiões catiônicas em sua superfície o que facilita sua interação com o lipídeo A, que é um componente dos lipopolissacarídeos (LPS) da membrana de

bactérias Gram-negativas. Essa interação ocasiona dano à parede celular bacteriana, modificando sua permeabilidade, levando a liberação da porção LPS e o conseqüente colapso da bactéria (APPELMELK et al., 1994; ELISSON et al., 1988). Devido esses danos causados pela Lf na membrana da bactéria, a Lf é capaz de aumentar o efeito de drogas comerciais como a rifampicina (ELISSON et al., 1988). Outros estudos combinam a Lf a terapias padrão contra infecções bacterianas a fim de diminuir o tempo de recuperação e minimizar os efeitos colaterais do tratamento pela diminuição da dosagem dos antibióticos (DE BORTOLI et al., 2007).

Interessante notar que a importância do ferro para o crescimento bacteriano, combinado com a capacidade de elementos do hospedeiro em sequestrar esse ferro, levaram algumas cepas bacterianas a desenvolverem estratégias de anular esse efeito. Sob condições de privação de ferro, algumas bactérias Gram-negativas desenvolveram um mecanismo de obter ferro a partir da Lf saturada por esse íon. Esse mecanismo envolve a interação da Lf com receptores localizados na superfície bacteriana (LEWIS et al., 1998). Além disso, muitos estudos têm mostrado o efeito da Lf contra diversos vírus tais como rotavírus, herpes vírus e HIV. A Lf previne a entrada dos vírus na célula por bloquear os receptores celulares ou pela interação direta com as partículas virais (HARMSSEN et al., 1995; VAN DER STRATE et al., 2001).

### 3.4 – ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA E BAIXA TEMPERATURA NAS PROTEÍNAS

“A indústria de alimentos prepara-se para o futuro. O crescimento da população mundial, os novos mercados dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, hábitos de consumo dos países industrializados, são exigências crescentes. Para a indústria de alimentos é importante oferecer produtos, cada vez mais, de alto valor nutritivo e igualmente seguro e saudável, onde a produção possa ser compatível e segura para o meio ambiente”. Esta citação foi feita em 1994 em Colônia-Alemanha por ERNST REIMERDES cientista da empresa suíça Nestlé, no .Food Tec. Congress. da Associação de Agricultura da Alemanha (Landwirtschafts-Gessellschaft, DLG). Com este objetivo é que novas técnicas estão sendo

desenvolvidas e/ou aperfeiçoadas, e, em geral, tem mostrado resultados surpreendentes, principalmente para produtos naturais que não sofrem alterações significativas quando comparadas com métodos térmicos convencionais. Estas novas técnicas, a maioria ainda em fase experimental, deverão trazer uma certa tranquilidade às exigências atuais. Os alimentos deverão ser processados, por exemplo, através de choques térmicos, radiações ultravioleta, ultra-som, impulso elétrico, campos magnéticos e altas pressões. Este último processo que tem, recentemente, atraído o interesse de cientistas. (COELHO, 2002)

Hite e Bridgman foram os primeiros a escrever sobre a aplicação da alta pressão hidrostática em biomoléculas. Isto foi em 1899 quando Hite, um químico da estação experimental agrícola de Morgantown, W. V. - USA, desenvolveu um equipamento capaz de produzir pressões da ordem de 100.000 psi (em torno de 680 MPa) submetendo vários alimentos e bebidas a alta pressão. Em 1914 Bridgman fez a primeira observação sistemática do efeito da pressão em proteína (HEREMANS, 1978). Ele observou que a aparência da albumina do ovo submetida a 7500 bar (~750 MPa) era semelhante ao seu cozimento a 100 °C, e que o efeito era irreversível. Isto levou a uma excepcional contribuição para a influência da pressão em biomoléculas nos últimos 50 anos, incluindo aí os alimentos (MERTENS e DEPLACE, 1993.)

A utilização de elevadas pressões hidrostáticas no processamento de alimentos que possuem água na sua composição, como por exemplo o leite, o suco de frutas e a carne conduz a uma total ou, no mínimo, parcial desativação dos microrganismos, assim como de enzimas. Além do que, o processamento com pressões altas pode provocar mudanças na estrutura das principais substâncias, como por exemplo as proteínas, os lipídeos assim como os polissacarídeos, provocando mudanças nas propriedades físicas destes alimentos, como a viscosidade, a consistência e as alterações sol-gel. Sabe-se também que o processamento em altas pressões pode provocar mudanças no equilíbrio de dissociação da água, dos sais, dos ácidos e de outras moléculas, dependendo, de alguma forma, do valor da pressão, da temperatura, assim como do tempo de duração da pressão utilizada, onde as mudanças podem ser tanto reversíveis como irreversíveis (COELHO, 2002).

Para as alterações ocorridas devido à alta pressão hidrostática, alterações estas tanto física quanto química, é válido o princípio de Le-Chatelier, princípio este que estabelece que, quando um sistema em estado de equilíbrio dinâmico for perturbado por alguma força externa, o sistema será deslocado para uma nova posição de equilíbrio para minimizar o efeito desta força, que poderá ser uma redução do volume causado pelo aumento da pressão ou vice versa. O efeito da pressão desempenha um importante papel na mudança da estrutura da água e, por consequência, na configuração de bio-macromoléculas (proteínas e polissacarídeos), sendo decisivo no surgimento de vários tipos de ligações não covalentes (pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrófobas). Sob alta pressão tem-se também o deslocamento da temperatura de mudança de fase, como por exemplo a elevação do ponto de fusão dos lipídeos (equação de Clausius-Clapeyron). O processamento em alta pressão, que na maioria dos casos acontece na temperatura ambiente, algumas vezes também em temperaturas até  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou, ainda, em temperaturas moderadas de no máximo  $40$  ou até mesmo  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Desta forma, tem-se uma alternativa aos processos de tratamento térmico para alimentos, cujo objetivo é tornar o alimento mais durável ou processar uma mudança com o objetivo de conseguir uma determinada qualidade física. (COELHO, 2002)

A pressão hidrostática é uma ferramenta poderosa para estudar o envelhecimento de proteínas bem como sua dinâmica e a estabilidade. Recentemente, as técnicas da pressão abriram um caminho importante para ajudar a compreensão de como os polipeptídios envelhecem-se. Os estudos cinéticos sob pressão proporcionam uma detalhada avaliação e compreensão do processo de envelhecimento protéico. A utilização de altas pressões hidrostáticas tem inúmeras vantagens sobre outros métodos, pois além de promover mudanças estruturais menos drásticas, não alteram quimicamente a amostra, o que seria altamente indesejável, pois a pressão apenas altera o volume do sistema. Esta característica contrasta com as perturbações da alta temperatura e os agentes desnaturantes, cujos efeitos dependem dos vários fatores. Um aumento na temperatura produz mudanças simultâneas na energia e no volume total.

Diversos estudos têm mostrado que um grande número de proteínas exhibe sensibilidade ao frio (PRIVALOV, 1986). Entretanto, a maioria delas só sofre desnaturação em temperaturas negativas, quando a água não se encontra mais no estado líquido. A pressão permite que se alcancem temperaturas abaixo de zero sem haver congelamento, uma vez que sob pressão o comportamento físico da água é diferente daquele à pressão atmosférica (FOGUEL & SILVA, 1994; OLIVEIRA et al., 1999 a, b).

Ligações covalentes são pouco afetadas por pressão. O principal efeito da alta pressão é realizar mudanças nas interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Estas têm consequências importantes nas estruturas secundárias e terciárias das proteínas. A alta pressão nas proteínas pode conduzir a mudanças conformacionais significativas, as quais ao mesmo tempo podem afetar a sua funcionalidade (KAJIYAMA et al., 1995). Em pressões suficientemente altas, proteínas vão se desenovelar completa ou parcialmente, e em altas concentrações elas vão precipitar ou agregar (GRANT et al., 2000).

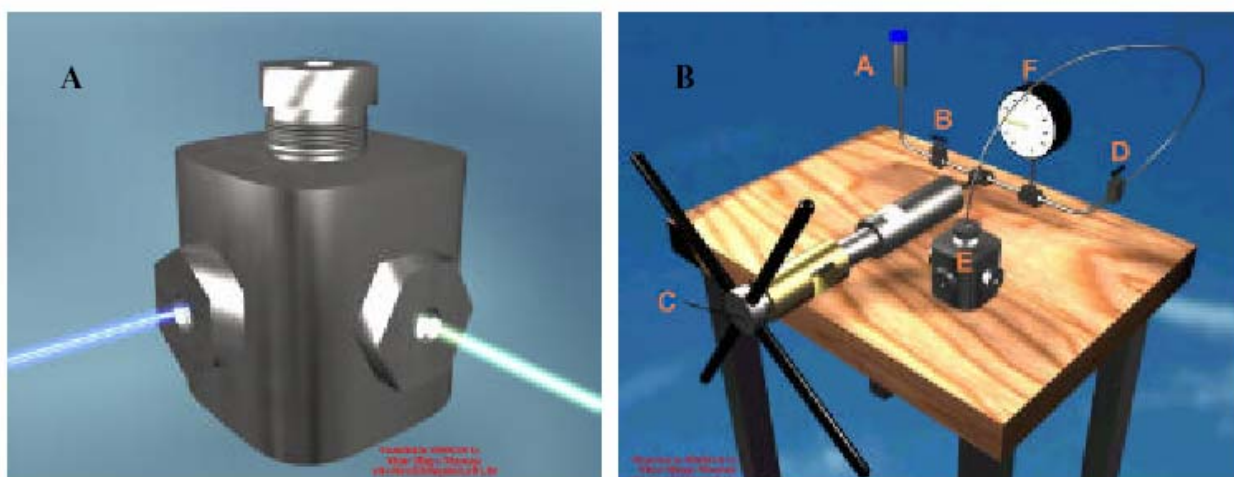
Quando uma solução de proteína é pressurizada, a proteína é desnaturada reversível ou irreversível dependendo da natureza da proteína e da pressão aplicada. Isto acontece por causa das ligações não covalentes (ponte de hidrogênio, ligações iônicas e ligações hidrofóbicas) que são destruídas ou formadas, correspondendo à diminuição no volume do sistema (PROCESSING, 2006).

No leite, a desnaturação de importantes proteínas do soro de leite,  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina é observada em pressões >58 ou >14 kpsi, respectivamente. A maior estabilidade à alta pressão tanto da  $\alpha$ -lactalbumina como da  $\beta$ -lactoglobulina tem sido relacionada com a estrutura molecular mais rígida devido ao fato de que elas possuem um número razoável de pontes de enxofre (HUPPERTZ et al., 2005).

A bomba de alta pressão (**Fig. 2a**) foi descrita por Paladini e Weber em 1981 e foi construída pela ISS Inc. (Champaign, IL) (PALADINI & WEBER, 1981). A bomba é feita em aço vascomax especialmente elaborado para esta utilização. Nela estão localizadas três janelas óticas de quartzo ou safira, que permitem que a luz chegue até

a amostra e que a fluorescência emitida seja coletada num ângulo de  $90^\circ$  C, permitindo que o monitoramento da fluorescência emitida seja feito antes, durante e depois da aplicação da pressão. Além das janelas, a bomba possui também uma entrada superior onde é acoplado um tubo flexível que a conecta ao gerador de pressão. A amostra é colocada em uma pequena cubeta de quartzo de aproximadamente 4 cm em formato de uma garrafa, a qual fica presa a um suporte no interior da bomba para não permitir movimentos da cubeta durante a aplicação da pressão. Esta cubeta é fechada na sua extremidade por um tubo flexível de polietileno que tem por objetivo equalizar a pressão entre o meio hidrostático (utilizamos etanol absoluto por possuir um índice de refração muito próximo ao do quartzo) e a amostra que encontra-se no interior da cubeta. A bomba também suporta diferentes temperaturas com a adição de um banho-maria circulatório (Fisher Scientific), usando gás nitrogênio para evitar a condensação de água na superfície ótica. O segundo constituinte do sistema de pressão é o gerador de pressão propriamente dito (**Fig. 2b**). Ele é composto por um pistão que é operado manualmente e que tem por objetivo comprimir o etanol no interior da tubulação, por duas válvulas que controlam o fluxo de etanol no tubo que é conectado à bomba e finalmente de um manômetro que é capaz de acompanhar a pressão gerada no sistema.





**Figura 2 – Sistema de alta pressão hidrostática.**

Ilustração dos componentes do sistema de alta pressão. (A) Bomba de pressão e as suas janelas ópticas. (B) Componentes do gerador de pressão: (A) reservatório de etanol; (B) válvula que controla a saída do etanol para o gerador de pressão; (C) gerador manual de pressão; (D) válvula que controla a saída do etanol do gerador de pressão para a bomba de pressão; (E) bomba de pressão onde é colocada a amostra; (F) manômetro que afere a pressão aplicada na amostra.

### 3.5 - A UTILIZAÇÃO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA INDÚSTRIA

Em geral, o processamento de alimentos sob pressões entre 29 e 87 kpsi (método hidrostático) inativa leveduras, fungos e a maioria das células vegetativas de bactérias incluindo a maioria dos patógenos infecciosos presentes nos alimentos; esporos de bactérias e fungos não são inativados por pressões de até 145 kpsi (GOULD, 1996; SMELT, 1998).

No processamento isostático, o produto é embalado em garrafa ou bolsa plástica e colocado no interior do vaso de pressão para ser processado. O processamento de produtos líquidos pode ser realizado através de um sistema semi-contínuo (fora da embalagem) utilizando três vasos de pressão e um sistema de válvulas automáticas, de modo que na primeira câmara a pressão do produto é aumentada até a pressão de processo, quando é liberado; na segunda câmara o produto fica sob a pressão e tempo especificados para o processo; e na terceira câmara o produto é descomprimido e encaminhado para envase asséptico.

A alta pressão hidrostática (HHP), tecnologia não-térmica, apresenta grande potencial de uso no processamento de alimentos. Sua aplicação pode estender a vida

útil dos alimentos e promover alterações desejáveis na textura com a vantagem de manter sua cor, sabor e valor nutritivo. Além disto, é reconhecida a eficiência desse tratamento sobre os microrganismos (SANGRONIS et al., 1997).

O primeiro produto processado por HHP foi introduzido no mercado japonês em 1990 e, gradualmente, outros alimentos processados por essa técnica surgiram em outros países. No mercado americano foi lançada com sucesso a pasta de abacate tratada por pressão (Guacamole) (CAMPOS, DOUSUALDO e CRISTIANINI, 2003). Na França, sucos de laranja e uva processados por HHP estão disponíveis no mercado. De acordo com SAN MARTÍN, BARBOSA-CÁNOVAS e SWANSON (2002), a vida-de-prateleira de sucos de frutas não-tratados foi estendida de 5 a 8 dias para aproximadamente três semanas quando pressurizados e mantidos estocados sob refrigeração. Como os sucos de frutas apresentam baixo pH e características sensoriais que são degradadas quando submetidas ao tratamento térmico, esses produtos são indicados para preservação pelo tratamento por HHP (CAMPOS, DOUSUALDO e CRISTIANINI, 2003).

O uso mais freqüente da HHP no processamento de alimentos tem sido a esterilização comercial, com conseqüente prolongamento da vida-de-prateleira. Essa tecnologia permite várias aplicações para a indústria de alimentos como, desnaturação de proteínas e enzimas, redução da temperatura de congelamento e de descongelamento, extração de substâncias orgânicas e controle de reações químicas e sínteses orgânicas (VARDAG, DIERKES e KORNER, 1995). O processamento por alta pressão também pode induzir mudanças relevantes na textura dos alimentos (resultantes da redução no volume e de mudanças no pH) e na constante de solubilidade de seus componentes (WILLIAMS, 1994). A preservação de vitaminas e compostos responsáveis pelo aroma e sabor se deve ao fato da HHP destruir ligações iônicas, hidrofóbicas e de hidrogênio dos alimentos, sem afetar as ligações covalentes. Somente ligações responsáveis pela estabilização de estruturas tridimensionais de moléculas como proteínas e polissacarídeos são alteradas (ALPAS e BOZOGLU, 2003; ROSENTHAL e SILVA, 1997).

Os primeiros estudos que avaliaram o efeito da pressão hidrostática sobre microrganismos em alimentos foram realizados na França, por CERTES, em 1884, e

nos Estados Unidos, por HITE, entre 1899 e 1914. A partir de então, outros pesquisadores têm se dedicado ao estudo da HHP em alimentos (CHEFTEL, 1995). O tratamento de HHP pode garantir a destruição de até 8 ciclos logarítmicos de células bacterianas, sem alterar o sabor e o valor nutricional dos alimentos (DOGAN e ERKMEN, 2004; KALCHAYANAND et al., 1998).

A HHP produz alterações morfológicas, bioquímicas e genéticas que ocorrem na membrana e na parede celular dos microrganismos (SANGRONIS et al., 1997). Além disso, aumenta a permeabilidade da célula, inibe reações energéticas e desnatura enzimas essenciais ao crescimento e à reprodução de microrganismos (CALDERÓN-MIRANDA et al., 1998). Embora muitos estudos abordem o efeito da HHP sobre os microrganismos, as causas da inativação microbiana são ainda pouco compreendidas (CHEFTEL, 1995). Várias mudanças morfológicas são observadas com o aumento da pressão como compressão de vacúolos gasosos, alongamento da célula, separação da membrana da parede celular, contração da parede celular com formação de poros, modificações no citoesqueleto, modificações no núcleo e em organelas intracelulares, coagulação de proteínas citoplasmáticas e liberação dos constituintes intracelulares para o meio extracelular, entre outros (CAMPOS, DOUSUALDO e CRISTIANINI, 2003).

Uma hipótese para inativação microbiana por HHP está ligada à redução da atividade da ATPase, dependente de sódio e potássio, localizada na capa de fosfolipídios da membrana celular e envolvida no transporte ativo através da membrana. Desta forma, a ATPase torna-se incapaz de manter o fluxo de prótons provocando redução do pH interno e causando a morte celular (CHEFTEL, 1995). As moléculas de DNA são mais estáveis à HHP do que as proteínas devido ao fato da alta pressão favorecer as pontes de hidrogênio, principal responsável pela estrutura dos ácidos nucléicos. Contudo, o processo de replicação e transcrição do DNA é inibido quando as células são submetidas à HHP pela inativação das enzimas envolvidas nesses processos (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 1999).

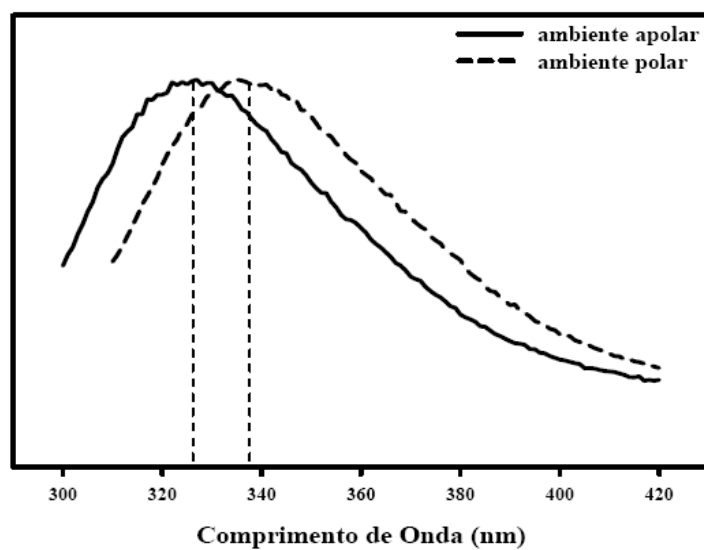
Apesar do tratamento por HHP em alimentos ter apresentado grande evolução, constituindo alternativa prática ao tratamento térmico, seu custo ainda é elevado (COELHO, 2002). Com o desenvolvimento tecnológico, a perspectiva é de que

esses custos se tornem mais acessíveis possibilitando o surgimento no mercado de maior número de produtos submetidos a esse tratamento (SMELT, 1998). Desta forma, a HHP apresenta grande potencial de utilização na indústria (DELIZA et al., 2005).

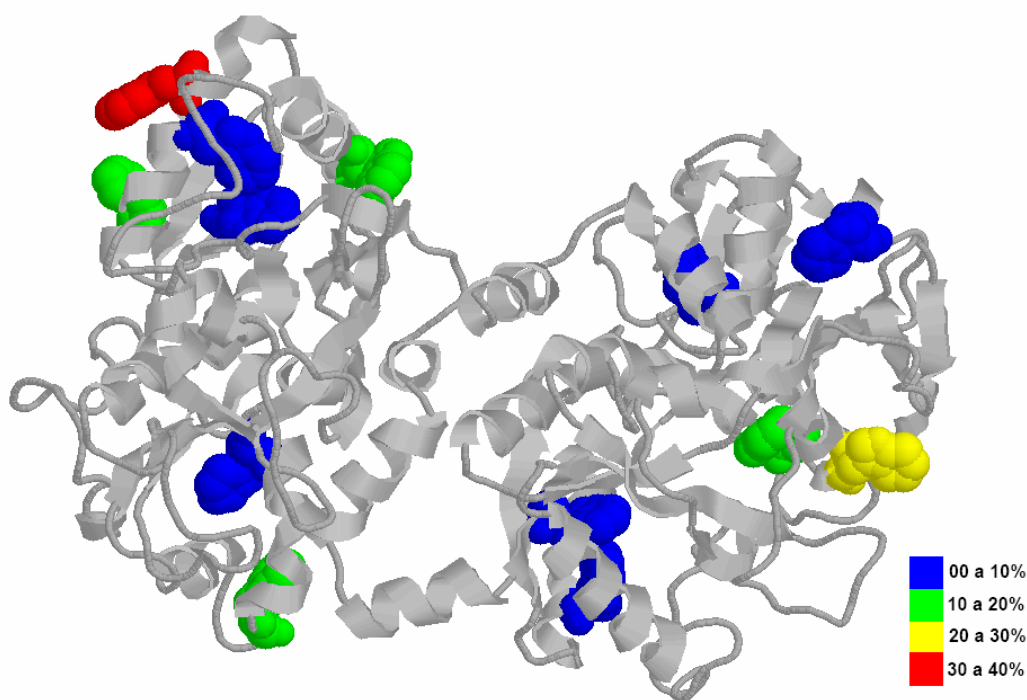
### 3.6 - ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A espectroscopia de fluorescência permite estudar a dinâmica de proteínas ou mesmo de complexos protéicos, uma vez que ambas ocorrem em escalas de tempo muito próximas. É possível acompanhar a emissão de fluorescência dos triptofanos, por serem moléculas hidrofóbicas muito sensíveis a qualquer mudança de polaridade do meio.

A mudança na emissão de fluorescência dos triptofanos, quando excitados em um determinado comprimento de onda, reflete nada mais que as mudanças de polaridade do meio em que eles se encontram. Então, é possível acompanhar a desnaturação protéica quando a mesma é submetida a perturbações químicas ou físicas, pela mudança no espectro de emissão de fluorescência do triptofano, ou seja, por mudanças no centro de massa do espectro para comprimentos de onda maiores. Em ambientes apolares, ou seja, com pouco acesso ao solvente, os triptofanos emitem fluorescência em comprimentos de onda menores (em torno de 330 nm) e, portanto, mais energéticos. À medida que a proteína vai expondo seus triptofanos para o meio aquoso, estes passam então a emitir em comprimentos de onda maiores e menos energéticos, uma vez que parte dessa energia é gasta para ocorrer uma reorientação das moléculas do solvente (**Fig.3**) (LAKOWICZ, 1983). A bLf possui treze triptofanos em sua estrutura sendo que os mesmos encontram-se pouco acessíveis ao solvente, o que proporciona uma excelente abordagem para monitoramento das mudanças conformacionais. (**Fig. 4**).



**Figura 3: Espectro de emissão de fluorescência do triptofano.**



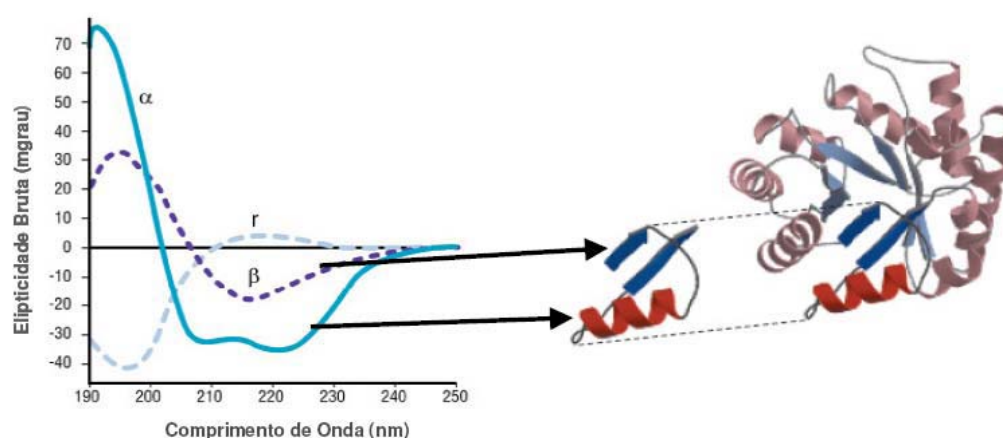
**Figura 4: Percentual de exposição dos triptofanos presentes na estrutura da lactoferrina bovina.**

Os triptofanos estão evidenciados na estrutura da bLf e a escala a direita mostra o seu grau de exposição ao solvente. Essa estrutura foi desenhada utilizando-se o software MolMol (KORADI et al., 1996) à partir de dados cristalográficos depositados no "Protein Data Bank" sob o nº 1BLF (MOORE et al., 1997).

### 3.7 - DICROÍSMO CIRCULAR

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica que se apresenta como ideal para o estudo de moléculas quirais em solução, pois é a única técnica com sensibilidade para detectar mudanças nestes sistemas assimétricos (KELLY; PRICE, 1997). Macromoléculas biológicas, tais como proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, são compostos de muitas unidades opticamente ativas que exibem sinal de CD. Moléculas opticamente ativas interagem com a luz polarizada e provocam alteração na polarização da luz incidente. A técnica de CD detecta essa alteração através da medida da diferença da absorção da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda após esta passar através da amostra (KELLY; PRICE, 1997).

O espectro de CD de proteínas pode fornecer dados sobre a composição da estrutura secundária das proteínas e, quando combinada com outras técnicas estruturais, pode ter um importante papel no estudo do enovelamento e desenovelamento protéico (desnaturação). As mudanças na estrutura secundária das proteínas podem ser avaliadas pela emissão em comprimentos de onda entre 190 e 240 nm (faixa espectral do UV-distante). Foram descritos espectros de CD distintos para  $\alpha$ -hélice, folhas  $\beta$ , estruturas randômicas entre outras (**Fig. 5**) (KELLY; PRICE, 1997). Essa ferramenta permite estudar a dinâmica do enovelamento da estrutura secundária de proteínas em solução.



**Figura 5: Espectros de dicroísmo circular de componentes da estrutura secundária de proteínas.** (KELLY; PRICE, 1997)

## 4 – METODOLOGIA

### 4.1 - PRESSÃO HIDROSTÁTICA E TERMODINÂMICA

Os efeitos da pressão hidrostática sobre a energia livre de Gibbs e sobre a constante de equilíbrio nos processos de dissociação e desnaturação das proteínas dependem exclusivamente da variação de volume ( $\Delta V$ ), conforme expresso na equação:

$$K_d(p) = K_{do} \exp(p \Delta V/RT) \quad (1)$$

onde  $K_d(p)$  e  $K_{do}$  são as constantes de equilíbrio de associação à pressão ( $p$ ) e à pressão atmosférica, respectivamente e  $\Delta V$  é a variação de volume de associação.  $RT$  é a constante universal dos gases vezes a temperatura. Conforme observado nesta fórmula, o emprego de pressão apenas altera a constante de dissociação da reação em função da variação de volume e de nenhum outro parâmetro termodinâmico adicional.

Introduzindo-se o grau de dissociação à pressão  $p$  ( $\alpha_p$ ), podemos deduzir a equação geral para os processos de dissociação e desnaturação (SILVA & WEBER, 1993):

$$\ln(\alpha_p^n / 1 - \alpha_p) = p(\Delta V/RT) + \ln(K_{do}/n^n C^{(n-1)}) \quad (2)$$

onde  $C$  é a concentração total de proteína,  $n$  é o número de subunidades e  $\alpha_p$  o grau de dissociação ou desnaturação em cada pressão, calculado a partir dos dados experimentais obtidos à medida que a pressão é aumentada.

Apesar da aparente complexidade desta equação, esta é uma típica equação de reta ( $y=ax+b$ ), onde a variação de volume ( $\Delta V$ ) é obtida a partir do coeficiente angular da reta e a constante de equilíbrio à pressão atmosférica ( $K_{do}$ ) é obtida a partir do intercepto no eixo das ordenadas (por extrapolação).

Nos processos de desnaturação, a ordem da reação ( $n$ ) é igual a 1 e o equilíbrio não depende da concentração da amostra. Nos processos de dissociação ( $n > 1$ ), o grau de dissociação ( $\alpha$ ) depende da concentração da amostra.

A pressão era aumentada em intervalos de 3 em 3 kpsi sendo a amostra incubada por 10 minutos em cada pressão. Os experimentos foram realizados com a bLf na concentração final de 100  $\mu\text{g/ml}$  diluída em tampão 25 mM de Tris 25 mM, 150 mM de NaCl, pH 7,5.

## 4.2 - MEDIDAS ESPECTROSCÓPICAS

### 4.2.1 - Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de fluorescência foram registrados em um espectrofluorímetro modelo ISSK2 (ISS Inc., Champaign, IL). Os experimentos foram realizados com a bLf na concentração final de 100  $\mu\text{g/ml}$  diluída em tampão 25 mM de Tris 25 mM, 150 mM de NaCl, pH 7,5. Nas curvas de uréia as amostras foram incubadas “overnight” em cada concentração. A espectroscopia de fluorescência permite estudar a dinâmica de proteínas ou mesmo de complexos protéicos, uma vez que ambas ocorrem em escalas de tempo muito próximas.

O centro de massa espectral  $\langle \nu \rangle$ , que é obtido pela emissão de fluorescência do triptofano, é diretamente proporcional à energia de emissão e pode ser calculado conforme a equação abaixo:

$$\langle \nu \rangle = \frac{\sum \nu_i \cdot F_i}{\sum F_i} \quad (3)$$

onde  $F_i$  é a fluorescência emitida em um determinado número de onda  $\nu_i$ , sendo o somatório realizado a partir de uma grande quantidade de valores  $F$ .



#### 4.2.2 - Dicroísmo Circular no UV-distante

Os espectros de CD são obtidos em um espectropolarímetro Jasco modelo J-715 1505 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan). Os espectros são obtidos usando uma cubeta de quartzo de 0.1 cm de caminho ótico e analisados na região de 190 a 300 nm.

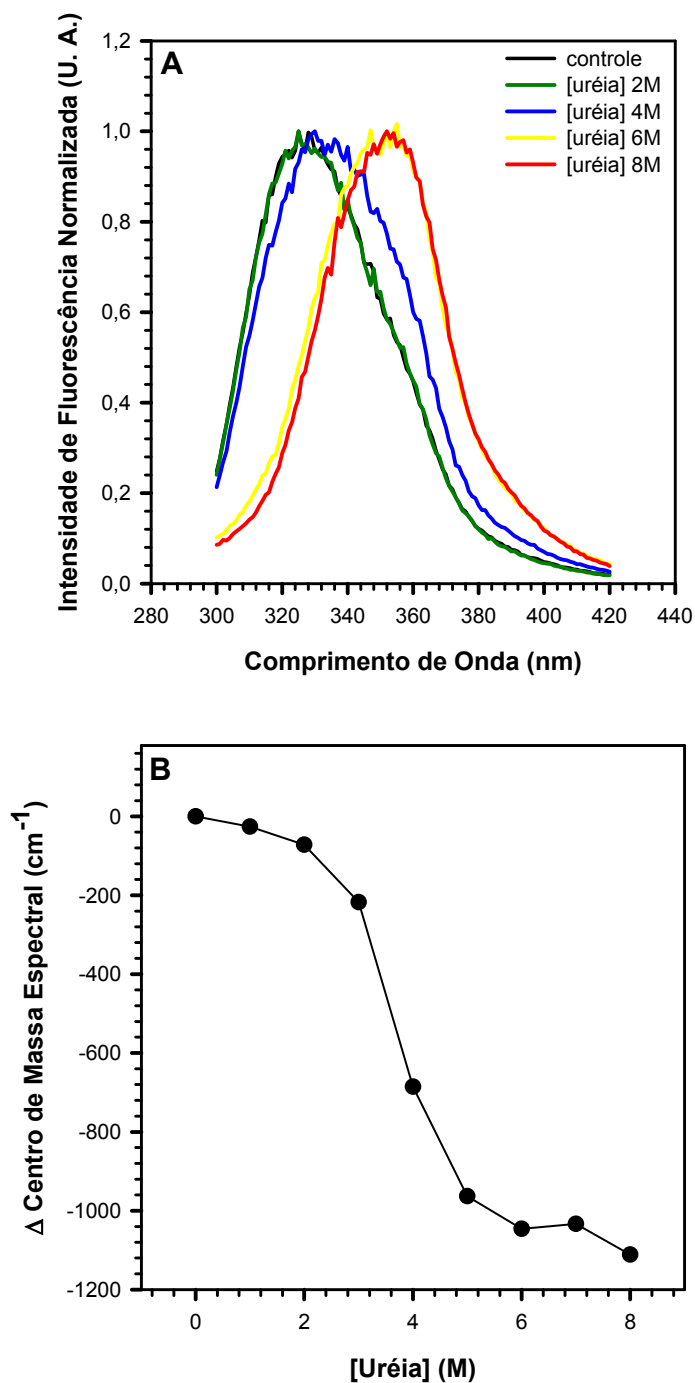
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido recentes descobertas a cerca das funções biológicas da lactoferrina, um melhor entendimento sobre suas características estruturais é necessário para sua potencial utilização como componente bioativo. Uma vez que novos métodos de esterilização comercial do leite, como a alta pressão, têm sido cada vez mais utilizados, é fundamental avaliar o efeito desse método na estrutura da bLf. Nesse trabalho, o objetivo foi avaliar os efeitos da alta pressão, baixa temperatura e uréia na estrutura da bLf a fim de entender um pouco melhor seu processo de desnaturação. Esses efeitos foram analisados utilizando-se dicróismo circular e espectroscopia de fluorescência.

A uréia é um potente agente desnaturante de proteínas que age em sua estrutura terciária pelo rompimento de pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações eletrostáticas. A fim de caracterizar o ponto final da desnaturação da bLf, foram realizados alguns experimentos onde foi utilizado concentrações crescentes de uréia (1-8M). As amostras foram incubadas “overnight” em cada concentração de uréia. Foi monitorado inicialmente a estrutura terciária da bLf através da análise das mudanças na emissão de fluorescência dos triptofanos presentes em sua estrutura e também sua estrutura secundária através de dicróismo circular (CD). Foi possível verificar que, apenas a partir de 3M de uréia, a estrutura da bLf começa a sofrer mudanças significativas. Essas mudanças podem ser acompanhadas através dos espectros de emissão do triptofano, que mostram o desvio do espectro de emissão de fluorescência do triptofano para comprimentos de onda maiores, portanto de menor energia, que refletem a exposição destes resíduos para ambientes polares. Essa diferença entre o estado nativo e estado totalmente desenovelado pode ser observada através do desvio do pico máximo de emissão de fluorescência dos triptofanos de 320 para 350 nm (**Fig. 6a**). O centro de massa nada mais é que a tradução desse desvio para valores numéricos. Sendo assim, os valores de centro de massa são inversamente proporcionais aos valores do espectro de emissão de fluorescência dos triptofanos, expressos em nanômetros. Então, foi possível observar que a partir de 5M de uréia o processo de desnaturação já se encontra em seu ponto final ( $1.100 \text{ cm}^{-1}$ ). (**Fig. 6b**). Essa diferença reflete uma mudança no ambiente dos triptofanos uma vez

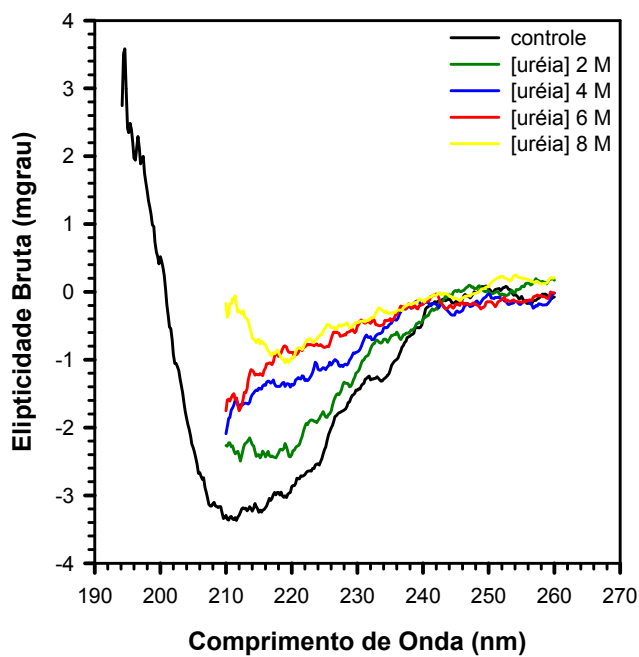
que eles são expostos à medida que a proteína vai sendo desnaturada pela ação da uréia.

O dicroísmo circular é uma técnica amplamente empregada na análise de proteínas devido à sua capacidade de detectar o grau de rotação das cadeias peptídicas que vão dar origem a estruturas como  $\alpha$ -hélices, folhas  $\beta$ , “random coil” e etc (GORE, 2000). As  $\alpha$ -hélices se caracterizam por apresentarem dois picos negativos, um em 220 nm e outro em 208 nm, e por ter um maior grau de elipticidade que os outros padrões de enovelamento. As folhas  $\beta$  possuem características menos marcantes devido a elas serem menos solúveis em solventes com uma boa transmissão de U.V. Estas estruturas apresentam um pico negativo próximo a 216 nm e um pico positivo em aproximadamente 195 nm. Ao analisar, através de técnicas de (CD) o efeito da uréia na estrutura secundária da bLf, foi verificado que ela é afetada de uma maneira muito mais gradual quando comparado com as mudanças na estrutura terciária (**Fig. 7**).



**Figura 6: Efeito da uréia na lactoferrina bovina acompanhada pelas mudanças no microambiente dos triptofanos.**

O efeito da uréia na estrutura terciária da bLf foi monitorada pelas mudanças nos valores de centro de massa da emissão de fluorescência dos triptofanos presentes na estrutura da proteína. Em **A**, observam-se os espectros de emissão de fluorescência dos triptofanos. Em **B**, pode-se verificar os pontos da desnaturação por uréia da bLf. A concentração final utilizada foi de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e os dados foram obtidos em tampão Tris 25 mM, NaCl 150 mM (pH 7,5). A amostra foi excitada em 280 nm e a emissão de fluorescência foi varrida de 300 a 420 nm. Esses dados representam a média de três experimentos independentes.

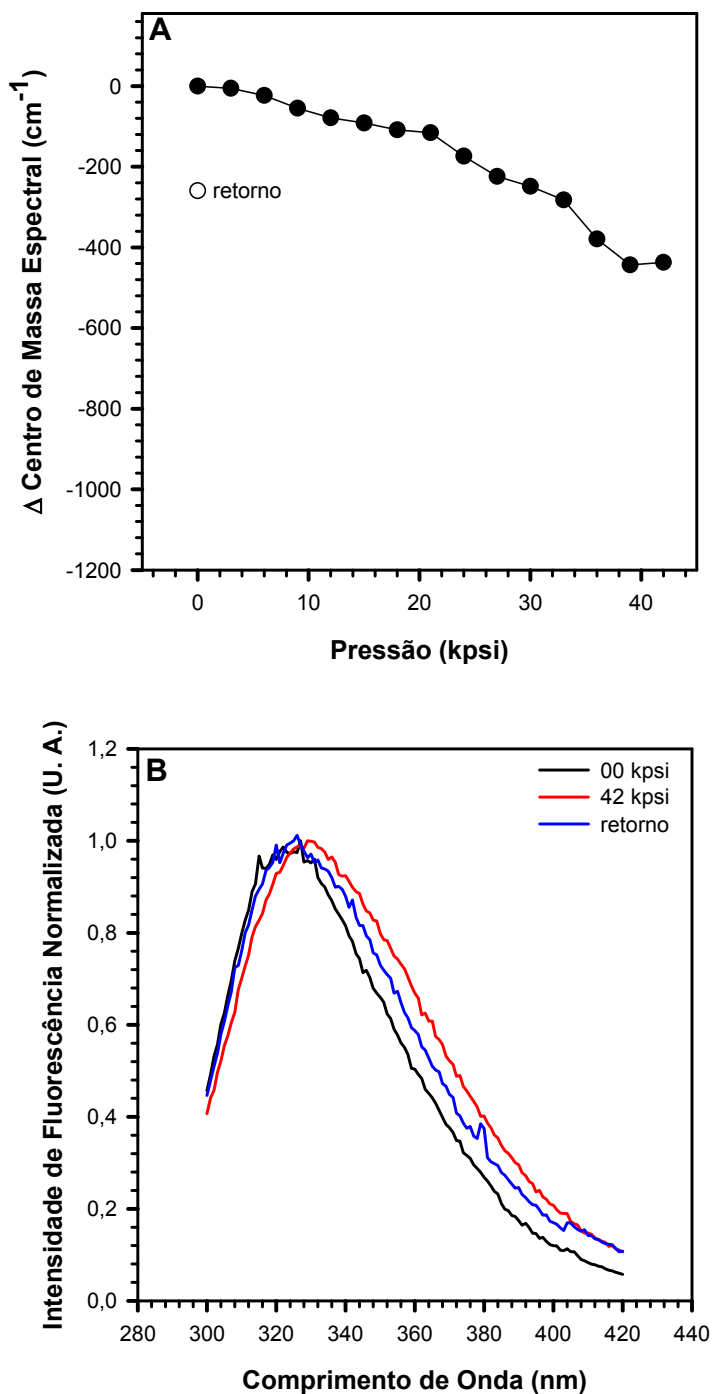


**Figura 7: Efeito da uréia na estrutura secundária da lactoferrina bovina acompanhada por dicroísmo circular**

Mudanças na estrutura secundária da lactoferrina pela adição de uréia foram monitoradas por dicroísmo circular. A amostra foi diluída para a concentração final de 200  $\mu\text{g/mL}$  e os espectros foram obtidos em tampão Tris 25 mM, NaCl 150 mM (pH 7,5), usando uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho ótico. Esses dados representam a média de três experimentos independentes.

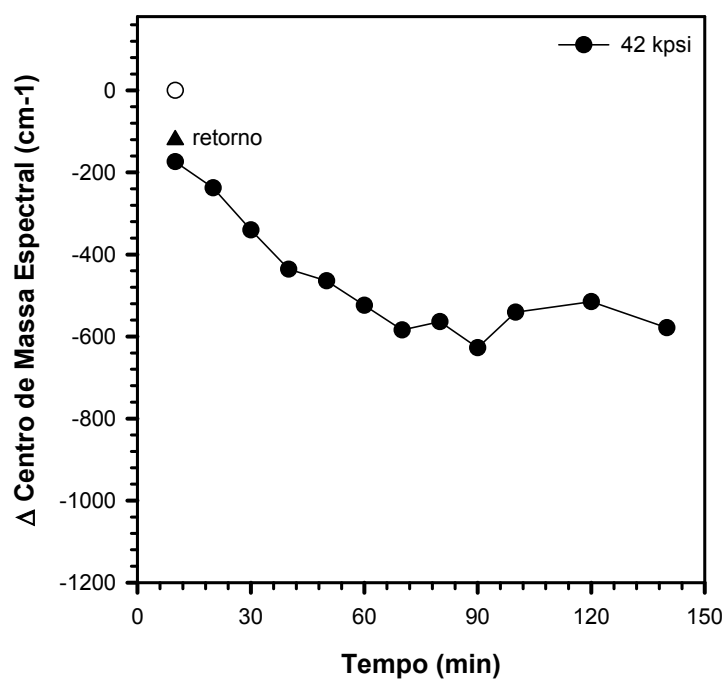
Estudos recentes a cerca do efeito da pressão em macromoléculas tem elucidado várias questões sobre as interações proteína-proteína, proteína-ácido nucléico bem como partículas virais. (SILVA; FOGUEL; ROYER, 2001; FOGUEL; SILVA, 2004). A alta pressão hidrostática causa mudanças menos drásticas quando comparada a desnaturação por uréia e permite que sejam investigados os diferentes estados de enovelamento das proteínas (SILVA; FOGUEL; ROYER, 2001). Uma das vantagens desse método é que ele não interfere quimicamente na amostra uma vez que as mudanças são causadas exclusivamente pelas mudanças no volume do sistema. Nesta dissertação nós submetemos a bLf a pressões de até 42 kpsi. Nossos resultados mostram que a bLf mostrou-se relativamente estável a pressões de até 20 kpsi. Após isto a estrutura da bLf foi afetada pela pressão onde o desvio total nos valores de centro de massa foi de cerca de  $450 \text{ cm}^{-1}$  (**Fig. 8a**). Cabe ressaltar que essa mudança estrutural foi parcialmente reversível quando a amostra foi novamente colocada à pressão atmosférica. Essas diferenças podem também ser percebidas ao analisarmos os espectros de emissão de fluorescência do triptofano (**Fig. 8b**).

Uma vez que, durante o experimento anterior a pressão foi aplicada gradualmente e o tempo de incubação em cada pressão era de 10 minutos, decidimos verificar a influência do tempo na desnaturação da bLf por pressão. Realizamos então experimentos onde a pressão era aumentada para 42 kpsi e a desnaturação acompanhada, através dos valores de centro de massa, por até 140 minutos (**Fig. 9**). Pudemos observar que, quando a pressão era aplicada rapidamente, o desvio no valor do centro de massa era de apenas  $200 \text{ cm}^{-1}$ , contra os  $450 \text{ cm}^{-1}$  quando a pressão era aumentada gradualmente. Verificamos também um retorno parcial da estrutura da proteína através dos valores de centro de massa. Esse resultado mostrou claramente que o processo de desnaturação por pressão foi dependente de tempo.



**Figura 8: Efeito da pressão na lactoferrina bovina acompanhada pelas mudanças no microambiente dos triptofanos.**

O efeito da pressão na estrutura da bLf foi monitorada pelas mudanças nos valores de centro de massa da emissão de fluorescência dos triptofanos presentes na estrutura da proteína. Em **A**, pode-se verificar os pontos da desnaturação por uréia da bLf. Em **B**, observam-se os espectros de emissão de fluorescência dos triptofanos. A concentração final utilizada foi de 100 µg/mL e os dados foram obtidos em tampão Tris 25 mM, NaCl 150 mM (pH 7,5). Outras condições ver figura 7.



**Figura 9: Efeito do tempo na desnaturação por pressão da lactoferrina bovina acompanhada pelas mudanças no microambiente dos triptofanos.**

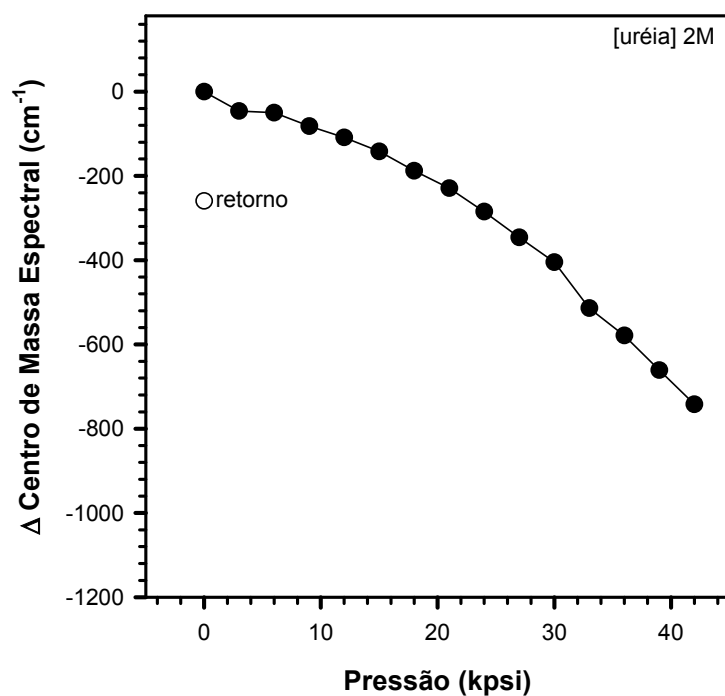
O efeito do tempo na desnaturação por pressão da estrutura da bLf foi monitorada pelas mudanças nos valores de centro de massa da emissão de fluorescência dos triptofanos presentes na estrutura da proteína. A concentração final utilizada foi de 100  $\mu$ g/mL e os dados foram obtidos em tampão Tris 25 mM, NaCl 150 mM (pH 7,5). Outras condições ver figura 7.



Como descrito previamente para algumas proteínas, a pressão pode não ser capaz de causar a completa desnaturação devido à pequena mudança na variação de volume. A fim de tentar obter a completa desnaturação, faz-se necessário combinar a pressão com agentes desnaturantes e/ou baixa temperatura. (SILVA et al., 1996; SILVA; FOGUEL; ROYER, 2001). Em nosso caso, combinamos inicialmente a pressão a concentrações sub-desnaturantes de uréia. Decidimos utilizar 2M de uréia uma vez que nessa concentração a bLf não sofre nenhuma mudança significativa em sua estrutura. Nossos resultados mostraram que a pressão, em presença de uréia, foi muito mais efetiva para provocar a desnaturação da bLf. Podemos observar que a variação total no valor de centro de massa foi de  $750 \text{ cm}^{-1}$ , maior, portanto, do que os  $450 \text{ cm}^{-1}$  da bLf sem a presença de uréia (**Fig. 10**).

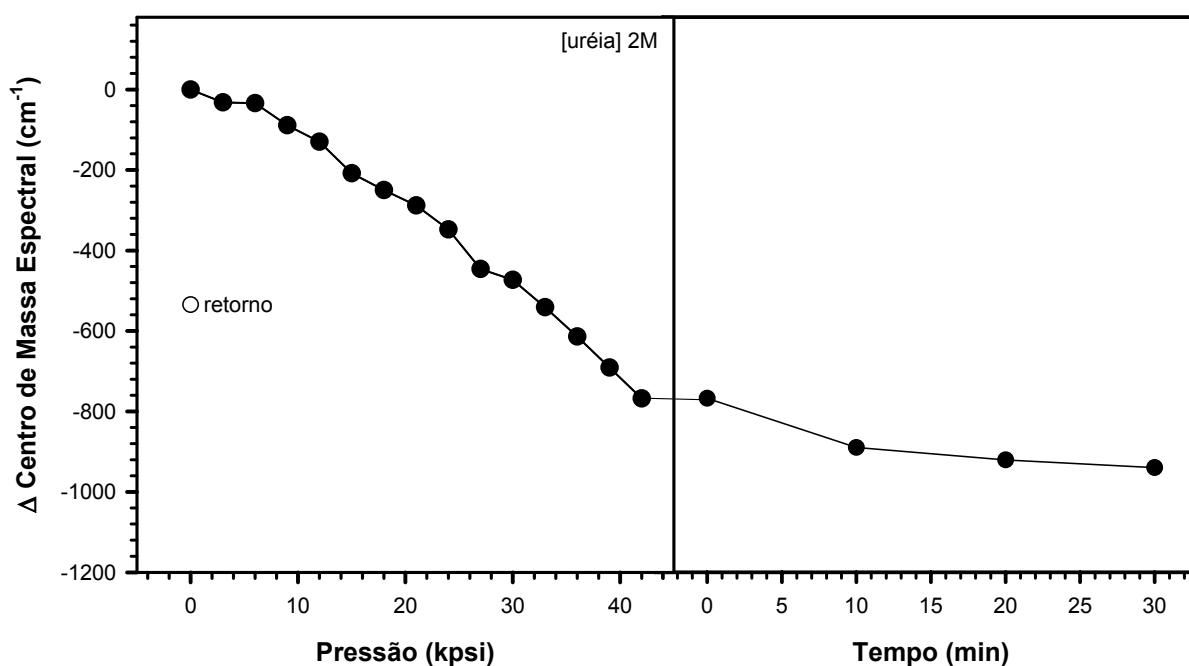
Verificamos também se o tempo de incubação teria influência na desnaturação por pressão combinada a concentrações sub-desnaturantes de uréia da bLf. Realizamos experimentos onde a bLf foi pressurizada gradualmente em presença de 2M de uréia e em seguida acompanhamos as mudanças no centro de massa durante 30 minutos. Observamos que não ocorreram mudanças significativas, o que significa que a desnaturação por pressão combinada com uréia não é um processo dependente de tempo (**Fig. 11**).

Uma vez que a somente a pressão não foi capaz de causar a desnaturação da bLf, decidimos utilizar também temperaturas abaixo de  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  para tentar promover a desnaturação total da proteína através de métodos físicos. Já foi verificado que um grande número de proteínas e vírus sofre desnaturação/inativação pela diminuição da temperatura (SILVA et al. 1996; PRIVALOV et al. 1986; SILVA et al. 2002). Em pressões acima de 30 kpsi, o ponto de congelamento da água muda para aproximadamente  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ , o que nos permitiu analisar a amostra ainda em estado líquido até  $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nossos resultados mostram que o abaixamento de temperatura até  $-10 \text{ }^\circ\text{C}$  não foi capaz de causar mudanças significativas na estrutura da bLf uma vez que o processo de desnaturação por pressão apresenta uma dependência de tempo. A diminuição do valor de centro massa foi exatamente o mesmo do atingido quando a bLf foi submetida a gradualmente pressão (**Fig. 12**).



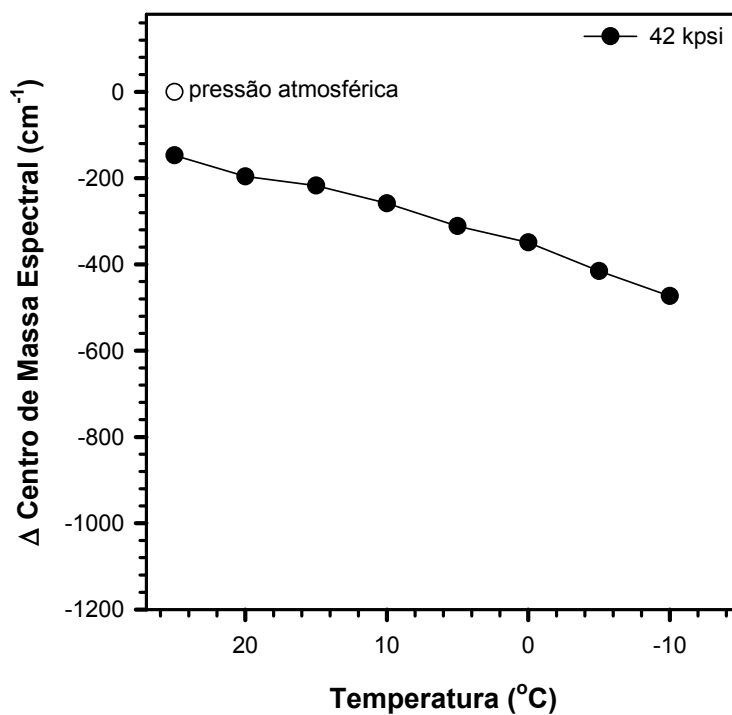
**Figura 10: Efeito da pressão combinada a uréia na lactoferrina bovina acompanhada pelas mudanças no microambiente dos triptofanos.**

O efeito da pressão combinada a 2M de uréia na estrutura da bLf foi monitorada pelas mudanças nos valores de centro de massa da emissão de fluorescência dos triptofanos presentes na estrutura da proteína. A concentração final utilizada foi de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e os dados foram obtidos em tampão Tris 25 mM, NaCl 150 mM (pH 7,5). Outras condições ver figura 7.



**Figura 11: Efeito do tempo na desnaturação por pressão combinada a uréia da lactoferrina bovina acompanhada pelas mudanças no microambiente dos triptofanos.**

O efeito do tempo na desnaturação por pressão combinada com 2M de uréia da estrutura da bLf foi monitorada pelas mudanças nos valores de centro de massa da emissão de fluorescência dos triptofanos presentes na estrutura da proteína. A concentração final utilizada foi de  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  e os dados foram obtidos em tampão Tris 25 mM, NaCl 150 mM (pH 7,5). Outras condições ver figura 7.



**Figura 12: Efeito da baixa temperatura na lactoferrina bovina acompanhada pelas mudanças no microambiente dos triptofanos.**

O efeito da baixa temperatura na estrutura da bLf foi monitorada pelas mudanças nos valores de centro de massa da emissão de fluorescência dos triptofanos presentes na estrutura da proteína. A concentração final utilizada foi de 100  $\mu\text{g/mL}$  e os dados foram obtidos em tampão Tris 25 mM, NaCl 150 mM (pH 7,5). Outras condições ver figura 7.

## 6 – CONCLUSÃO

Altas pressões estão sendo utilizadas no setor alimentício para a inativação de microrganismos. Alimentos pasteurizados por meio de altas pressões já estão sendo comercializados no Japão. Há um grande interesse neste processo também na Europa e nos Estados Unidos. Apesar do tratamento com alta pressão no setor de alimentos nos últimos anos ter mostrado uma dinâmica e já ter alcançado maturidade, como uma alternativa prática ao costumeiro tratamento térmico, ainda tem um custo muito elevado. No momento, fica difícil fazer um prognóstico do uso desta tecnologia de uma forma mais abrangente no setor de alimentos. Entretanto é sabido que a sua viabilidade acontece somente na substituição de alimentos que justifique um investimento e que tenha sentido econômico, como no caso de produtos específicos e de maior qualidade, mesmo que com elevados custos. No geral, faz-se necessário à condução de pesquisas que viabilizarão novas aplicações. No entanto é possível listar algumas aplicações mais comuns, mesmo que em fase experimental. (COELHO, 2002).

O desenvolvimento de equipamentos de alta pressão com maior capacidade, mais automatizado, com melhor controle de temperatura, melhor sanitização, mais resistente e de baixo custo constitui um pré-requisito para transferir para a prática industrial toda esta potencialidade de aplicação da pressão no campo da tecnologia de alimentos. Embalagens mais adequadas são também necessárias tanto para alimentos sólidos como líquidos (COELHO, 2002).

A alta pressão tem sido cada vez mais utilizada para o estudo dos processos de enovelamento/desenovelamento de proteínas e oligômeros protéicos. Mais recentemente, sua utilização como uma forma de esterilização comercial de alimentos tem aumento bastante. Sua grande vantagem em relação aos métodos tradicionais é que seus efeitos ocorrem exclusivamente pela variação de volume do sistema, não interferindo assim quimicamente na amostra. Dessa forma, a alta pressão permite uma esterilização segura mantendo as características sensoriais do produto. Uma vez que a bLf é uma das proteínas mais importantes do leite, pelo seu papel biológico, é fundamental o claro entendimento dos efeitos da alta pressão e baixas temperaturas nessa proteína.

Podemos concluir então que, 5M de uréia são suficientes para acessar o estado totalmente desenovelado (desnaturação) da bLf enquanto que a alta pressão, mesmo combinada a temperaturas de até -10 °C, não foi capaz de levar a desnaturação da total da proteína. Observamos também que, quando a pressão era aplicada de forma gradual, seu efeito era mais pronunciado quando comparada a aplicação rápida da pressão. Efeito similar a aplicação gradual da pressão só era obtido quando a pressão era aumentada rapidamente e a bLf mantida sob pressão por duas horas. Esses resultados mostraram então que o efeito da pressão na bLf é dependente de tempo. Verificamos também que, a alta pressão combinada com concentrações subdesnaturantes de uréia (2M), eram capazes de causar mudanças mais drásticas na estrutura da bLf.

Acreditamos que esse estudo é de grande importância para o entendimento dos efeitos da pressão na bLf e assim poder potencializar sua utilização como componente bioativo em alimentos.

## REFERÊNCIAS

ALPAS, H.; BOZOGLU, F. Efficiency of high pressure treatment for destruction of *Listeria monocytogenes* in fruit juice. **Immunology and Medical Microbiology**, v.35, p.269-273, 2003.

ALVES, D. R., Industrialização e comercialização do leite de consume no Brasil, **Produção de leite e sociedade: uma análise crítica da cadeia do leite no Brasil**. ed. FEPMVZ, Belo Horizonte, p.75-85, 2001

APPELMELK, B. J.; AN, Y. K.; GEERTS, M.; THIJS, B. G.; DE BOER, H. A.; MACLAREN, D. M.; DE GRAAFF, J.; NUIJENS, J. H. **Lactoferrin is a lipid A binding protein**. *Infect.Immun.*, v. 62, p. 2628-2632, 1994.

ANDERSON, B. F.; BAKER, H. M.; NORRIS, G. E.; RUMBALL, S. V.; BAKER, E. N. **Apo-lactoferrin structure demonstrates ligand-induced conformational change in transferrins**. *Nature*, v. 344, p. 784-787, 1990.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. São Paulo: Manole, 2003. 135 p.

ARNOLD, R. R.; COLE, M. F.; MCGHEE, J. R. **A bactericidal effect for human lactoferrin**. *Science*, v. 197, p. 263-265, 1977.

ARNOLD, R. R.; BREWER, M.; GAUTHIER, J. J. **Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms**. *Infect. Immun.*, v. 28, p. 893-898, 1980.

ARNOLD, R. R.; RUSSELL, J. E.; CHAMPION, W. J.; GAUTHIR, J. J. **Bactericidal activity of human lactoferrin: influence of physical conditions and metabolic state of the target microorganism**. *Infect. Immun.*, 32, p. 655-660, 1981.

BAKER, E. N. **Structure and reactivity of transferrins**. *Adv. Inorg. Chem.*, v. 41, p. 389-463, 1994b.

BALI, P. K.; AISEN, P. **Receptor-modulated iron release from transferrin: differential effects on the N- and C-terminal sites.** *Biochemistry*, v. 30, p. 9947-9952, 1991.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; POTHAKAMURY, U.R.; PALOU, E.; SWANSON, B.G. **Conservación no térmica de alimentos.** Zaragoza: Acribia, 1999.

BULLEN, J. J.; ROGERS, H. J.; LEIGH, L. **Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants.** *Br. Med. J.*, p. 69-75, 1972.

CALDERÓN-MIRANDA, M.L.; GONZÁLEZ, M.F.S.M.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. **Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: variables e inactivación microbiana.** *Brazilian Journal of Food and Technology*, v.1, p.3-11, 1998.

CAMPOS, F.P.; DOUSUALDO, G.L.; CRISTIANINI, M. Utilização da tecnologia de alta pressão no processamento de alimentos. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v.6, n.2, p.351-357, 2003.

CHEFTEL, J.C. **Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation.** *Food Science and Technology International*, v. 1, n. 2/3, p. 75-90, 1995.

CHEFTEL, J.C.; CULIOLI, J. **Effects of high pressure on meat: a review.** *Meat Science*, v.46, p.211-236, 1997.

COELHO, G.L.V. **Efeitos da alta pressão hidrostática em alimentos: aspectos físico-químicos.** *Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra*, v.21, n.1, p.105-110, 2002.

DE BORTOLI, N.; LEONARDI, G.; CIANCIA, E.; MERLO, A.; BELLINI, M.; COSTA, F.; MUMOLO, M. G.; RICCHIUTI, A.; CRISTIANI, F.; SANTI, S.; ROSSI, M.; MARCHI, S. ***Helicobacter pylori* eradication: a randomized prospective study of triple therapy versus triple therapy plus lactoferrin and probiotics.** *Am. J. Gastroenterol.*, v. 102, p. 951-956, 2007.



DELIZA, R.; ROSENTHAL, A.; ABADIO, F.B.D.; SILVA, C.H.O.; CASTILHO, C. **Application of high pressure technology in the fruit juice processing: benefits perceived by consumers.** Journal of Food Engineering, v.67, p.241-246, 2005.

DOGAN, C.; ERKMEN, O. **High pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation in broth, milk, and peach and orange juice.** Journal of Food Engineering, v.62, p.47-52, 2004.

ELLISON, R. T<sub>3rd</sub>.; GIEHL, T. J.; LAFORCE, F. M. **Damage of the outer membrane of enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin.** Infect. Immun., v. 56, p. 2774-2781, 1988.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Importância Econômica.** Gado do Leite. 2006. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/sistema/mata/importancia.html>>. Acesso em: 15 jul. 2008.

FARRELL, H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G. T.; BROWN, E. M.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; SWAISGOOD, H. E. **Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth Revision.** J. Dairy Sci., v. 87, p. 1641-1674, 2004.

FOGUEL, D., SILVA, J. L., **Cold Denaturation Of Arc Repressor-Operator Complex: The Role Of Entropy On Protein-Dna Recognition.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. USA, v.91, p.8244 - 8247, 1994.

FOGUEL, D., SILVA, J. L., **New insights into the mechanisms of protein misfolding and aggregation in amyloidogenic diseases derived from pressure studies.** Biochemistry 43, 11361–11370. 2004.

GERSTEIN, M.; ANDERSON, B.F.; NORRIS, G.E.; BAKER E.N.; LESK, A. M.; CHOTHIA, C. **Domain closure in lactoferrin: two hinges produce a see-saw motion between alternative close-packed interfaces.** J. Mol. Biol., v. 234, p. 357-372, 1993.

GONZÁLES, F. H. D. **Composição Bioquímica do leite e hormônios da lactação.** In: GONZÁLES, F.H.D.; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. (ed.) *Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras.* Porto Alegre: UFRGS, p. 5-22, 2001.

GOULD, G.W. **Methods for preservation and extension of shelf life**. International Journal of Food Microbiology, v. 33, n. 1, p.51- 64, 1996. GRANT, S.; PETTERSON, M.; LETDWARD, D. **Food Processing Gets Freshly Squeezed**. Chemistry & Industry. V.24, 2000.

HARMSSEN, M. C.; SWART, P. J.; DE BETHUNE, M. P.; PAUWELS, R.; DE CLERCQ, E.; THE, T. H.; MEIJER, D. K. **Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro**. J. Infect Dis. 172, p. 380-388, 1995.

HEREMANS, K. **High Pressure Chemistry**. KELM, H. (Ed.), D. Reidel Publishing Company, London, 467-487. 1978.

HUPPERTZ, T.; FOX, P. F.; KRUIF, K. G. de; LELLY, A. L., **High pressure-induced changes in bovine milk proteins: A review**. Biochimica et Biophysica Acta, 1764, p. 593-598, dez., 2005.

JENSSEN, H.; HANCOCK, R. R. W. **Antimicrobial properties of lactoferrina**. Biochimie ,2008. doi: 10.1016/j. biochi.2008.05.015.

KAJIYAMA, N.; ISOBE, S.; UEMURA, K.; NOGUCHI, A. **Changes of soy protein under ultra-high hydraulic pressure**. International Journal of Food Science and Technology, v. 30, n. 2, p. 147-158, 1995.

KALCHAYANAND, N.; SIKES, A.; DUNNE, C.P.; RAY, B. **Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization**. Food Microbiology, v.15, p.207-214, 1998.

KELLY, S.M., PRICE, N.C., **The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding**. Biochim Biophys Acta. Apr 4, 1338(2): 161-85, 1997.

KORADI, R., BILLETER, M. & WUTHRICH, K. MOLMOL: **A program for display and analysis of macromolecular structures**. J. Mol. Graph. 14: 51-55, 1996.

LEWIS, L. A.; ROHDE, K.; GIPSON, M.; BEHRENS, B.; GRAY, E.; TOTH, S. I.; ROE, B. A; DYER, D. W. **Identification and molecular analysis of lbpBA, which encodes**

**the two-component meningococcal lactoferrin receptor.** Infect. Immun., v. 66, p. 3017-3023, 1998.

LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence spectroscopy.* Plenum Press, New York, N. Y., 1983.

MACHADO, R. M. G.; FREIRE, V. H.; SILVA, P. C.; FIGUERÊDO, D.V.; FERREIRA, P. E. **Controle ambiental nas pequenas e médias indústrias de laticínios: Projeto Minas Ambiente.** Belo Horizonte: SEGRAC, 222 p., 2002.

MARSHALL, K. **Therapeutic applications of whey protein.** Alternative Medicine Review., v. 9, p. 136-156, 2004.

MASSON, P. L.; HEREMANS, J. F. **Lactoferrin in milk from different species.** Comp. Biochem. Physiol.B., v. 39, p. 119-129, 1971.

MEIRELES, A.J., **Leite Paulista – História da Formação de Um Sistema Cooperativista no Brasil,** ed. HRM,1983.

MERTENS, B. & DEPLACE, G.. **Food Technology,** 6, 164-169. 1993

MOORE, S. A.; ANDERSON, B. F.; GROOM, C. R.; HARIDAS, M.; BAKER, E. N. **Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution.** J. Mol. Biol., v. 274, p. 202-236, 1997.

OLIVEIRA, A.C., ISHIMARU, D., GONÇALVES, R.B., MASON, P., CARVALHO, D., SMITH, T., SILVA, J.L, **Low Temperature And Pressure Stability Of Picornaviruses: Implication For Virus Uncoating.** Biophysical Journal. USA, v.76, p.1270 - 1279, 1999a.

OLIVEIRA, A.C., VALENTE, A.P., ALEMIRDA, F., LIMA, S.M., ISHIMARU, D., GONÇALVES, R.B., FOGUEL, D., SILVA, J.L, **Hydrostatic pressure as a tool to study virus assembly: Inactivated vaccines and antiviral drugs.** NATO ASI SERIES C. Dordrecht, v.358, p.497 - 513, 1999b.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; JÚNIOR, L. C. G. C.; LEAL, L. **Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos**. 2. ed. Juiz de Fora: EPAMIG, 234 p., 2001.

PRIVALOV, P. L.; GRIKO, Y. U. V.; VENYAMINOV, S. Y. U.; KUTYSHENKO, V. P. **Cold denaturation of myoglobin**. J Mol Biol., v. 190, p. 487-98, 1986.

Processing, UK. High Pressure food. Disponível em: <http://server.age.psu.edu/fac//lrudayaraj/highpres/highpres.html>. Acesso em: 16/09/06.

PALADINI, A. A., Weber, G. **Pressure-induced reversible dissociation of enolase**. Biochemistry 20: 2587-2593, 1981.

ABLV – Associação Brasileira de Leite Longa Vida – **Relatório Anual 2000**, 2000.

RICHARDS, N. S. P. S. **Soro lácteo: Perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente**. Food Ingredients, v. 17, p. 20-27, 2002.

ROSENTHAL, A.; SILVA, J.L. Alimentos sob pressão. **Engenharia de Alimentos**, v.14, p.37-39, 1997.

SAN MARTÍN, M.F.; BARBOSA-CÁNOVAS; G.V.; SWANSON, B.G. Food processing by hydrostatic pressure. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.42, n.6, p.627-645, 2002.

SANGRONIS, E.; POTHAKAMURY, U.; RAMOS, A.M.; IBARZ, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. La alta presión hidrostática: una alternativa en el procesamiento no térmico de alimentos. **Alimentaria**, n.283, p.33-43, 1997.

SGARBIERI, V. C. **Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite**. Revista de Nutrição, Campinas, 17 (4), p. 397-409, out./dez., 2004.

SGARBIERI, V. C. **Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite**. Braz. J. Food Technol., v. 8, p. 43-56, 2005.

SILVA, J.L., FOGUEL, D., Da POIAN, A.T., PREVILEGE, P.E., **The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages.** *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 166–175. 1996.

SILVA, J.L., FOGUEL, D., ROYER, C., **Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure.** *Trends Biochem. Sci.* 26, 612–618. 2001.

SILVA, J.L., OLIVEIRA, A.C., GOMES, A.M., LIMA, L.M., MOHANA-BORGES, R., PACHECO, A.B., FOGUEL, D., **Pressure induces folding intermediates that are crucial for protein-DNA recognition and virus assembly.** *Biochim. Biophys. Acta* 1595, 250–265. 2002.

SILVA, J. L. & WEBER, G. **Pressure stability of proteins.** *Annu. Rev. Phys. Chem.* 44: 89-113, 1993.

SMELT, J.P.P. **Recent advances in the microbiology of high pressure processing.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 9, n.4, p.152-158, 1998.

VAN DER STRATE, B. W.; BELJAARS, L.; MOLEMA, G.; HARMSSEN, M. C.; MEIJER, D. K. **Antiviral activities of lactoferrin.** *Antiviral Res.*, v. 52, p. 225-239, 2001.

VARDAG, T.; DIERKES, H.; KORNER, P. High pressure food processing. **Food Technology Europe**, v.3, n.2, p. 106- 110, 1995.

WARD, P. P.; URIBE-LUNA, S.; CONNEELEY, O. M. **Lactoferrin in host defense.** *Biochem. Cell. Biol.*, v. 80, p. 95-102, 2002.

WILLIAMS, A. A new technology in food preservation and processing: part 11. **Nutrition and Food Science**, v.1, p.20-23, 1994.

YAMAUCHI, K.; TOMITA, M.; GIEHL, T.J.; ELLISON, R. T. **Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin derived lactoferrin peptide fragment.** *Infect. Immun.*, v. 61, p. 719-728, 1993.

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

**Dados Internacionais de catalogação-na-publicação  
Universidade Norte do Paraná  
Biblioteca Central  
Setor de Tratamento da Informação**

A573m André, Vanessa Adelaide Romanholi.  
Modificação na estrutura tridimensional da lactoferrina bovina /  
Vanessa Adelaide Romanholi André. Londrina: [s.n], 2009  
xii; 61p.

Dissertação (Mestrado). Ciência e Tecnologia do Leite.  
Universidade Norte do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Rafael Braga Gonçalves

1- Tecnologia do leite- dissertação de mestrado – UNOPAR  
2- Lactoferrina 3- Soro do leite 4- Alta pressão 5- Desnaturação 6-  
Esterilização I- Gonçalves, Rafael Braga, orient. II- Universidade  
Norte do Paraná.

CDU 637.142.2



# Universidade Norte do Paraná

## Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Programa do Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos treze dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e nove, no Auditório, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, desta Universidade, às quatorze horas, reuniu-se a Banca Examinadora indicada pelo Programa de Pós-Graduação e homologada pelo Colegiado de Pós-Graduação, conforme Protocolo nº. 70 de 12/02/2009, composta por 1. Prof. Dr. Rafael Braga Gonçalves, presidente da banca. 2. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Waleska Dias Schwarcz. 3. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi. A reunião tem por objetivo julgar o trabalho do (a) estudante *Vanessa Adelaide Romanholi André*, sob o nº. de matrícula 2319501311, sob o título "Modificações na estrutura tridimensional da lactoferrina bovina induzidas por alta pressão". Os trabalhos foram abertos pelo (a) presidente da banca. A seguir foi dada a palavra a(o) estudante para apresentação do trabalho. Cada examinador(a) argüiu o(a) mestrando(a), com tempos iguais de argüição e resposta. Terminadas as argüições, procedeu-se o julgamento do trabalho, concluindo a Banca Examinadora por sua **APROVAÇÃO**. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros.


Londrina, 13 de fevereiro de 2009.

#### Examinadores:

Prof. Dr. Rafael Braga Gonçalves

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Waleska Dias Schwarcz


Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Antonia P. C. Celligoi



---

Waleska Schwarcz

---



---